

TEORI DAN APLIKASI PEMBUATAN BIOETHANOL DARI SELULOSE (BAMBU)

**Ni Ketut Sari
Dira Ernawati**



**PERPUSTAKAAN NASIONAL REPUBLIK INDONESIA
KATALOG DALAM TERBITAN (KDT)**

**TEORI DAN APLIKASI
PEMBUATAN BIOTHANOL DARI SELULOSE
(BAMBU)**

Penulis
Ni Ketut Sari
Dira Ernawati

Desain Cover
Andi Ciyono

Layout
Mohammad Soeroso, BE
Copyright © 2017 JMP Surabaya

Diterbitkan & Dicetak Oleh
Jakad Media Publishing. 2017
Jl. Gayung Kebonsari I No. 1-3 Surabaya
Telp. : 081230444797; 85645678944
E-mail : jakadmedia@gmail.com
Anggota IKAPI no.

ISBN : 978-602-61918-0-9

**Hak cipta dilindungi oleh Undang-undang
Sanksi Pelanggaran Pasal 22
Undang-undang Nomor 19 Tahun 2002
Tentang Hak Cipta.**

**Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit**

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan buku dengan judul “Teori Dan Aplikasi Pembuatan Bioethanol Dari Selulosa (Bambu)”

Bahan yang disajikan di dalam buku ini penulis susun sebagai upaya memperkenalkan Teori Dan Aplikasi Pembuatan Bioethanol Dari Selulosa (Bambu) yang dapat dipergunakan sebagai acuan bagi para mahasiswa dan peneliti yang mempelajari bidang Pemanfaatan Tanaman Bambu Menjadi Bioethanol.

Dalam buku ini dibahas tentang proses pembuatan bioethanol dari selulosa dengan proses pretreatmen, proses delignifikasi, proses hidrolisis, proses fermentasi dan proses distilasi batch.

Selama penyusunan buku ini penulis menyadari masih jauh dari sempurna, oleh karenanya penulis mengharap adanya kritik dan saran demi penyempurnaan buku ini. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Jawa Timur yang dengan prakarsanya memacu minat penulis untuk menyusun buku ini.

Ucapan terima kasih penulis tujukan pula kepada semua pihak yang telah membantu mulai dari awal persiapan sampai terlaksananya penerbitan buku ini. Semoga apa yang tertuang dalam buku ini dapat menjadi pegangan bagi mahasiswa atau peneliti yang mempelajari bidang Teori Dan Aplikasi Pembuatan Bioethanol Dari Selulosa (Bambu).

Surabaya, Juli 2017

Penulis,

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Bioethanol dan Ethanol	2
1.3. Prospek Rumpuk Gajah sebagai Sumber Bahan Baku Bioethanol Tanaman Bambu.....	5
1.4. Pretreatmen Bambu	11
1.5. Proses Delignifikasi.....	12
1.6. Pendekatan Teoretik.....	18
1.7. Blok Diagram dan Uraian Kegiatan Penelitian.....	19
1.8. Kualitas bamboo.....	22
1.9. Proses Pretreatmen.....	23
1.10. Proses Delignifikasi.....	24
1.11. Proses Hidrolisis.....	25
1.12. Blok Diagram dan Uraian Kegiatan Penelitian.....	29
1.13. Kesimpulan.....	30
1.14. Saran.....	31
BA2 MIKROBIOLOGI	33
2.1. Pendahuluan.....	33
2.2. Peranan Mikrobiologi Dalam Bidang Teknologi Industri.....	34
2.3. Sejarah Mikrobiologi	37
2.4. Metabolisme Energi.....	40
BAB 3 SIFAT DAN KLASIFIKASI MIKROBA.....	47
3.1. Pendahuluan.....	47

3.2.	Jamur (Kapang).....	47
3.3.	Khamir.....	55
3.4.	Bakteri.....	58
BAB 4	PENANAMAN MIKROBA.....	65
4.1.	Pendahuluan	65
4.2.	Klasifikasi Mikroorganisme.....	65
4.3.	Konsep Mengenai Spesies.....	67
4.4.	Kategori Taksonomi.....	68
4.5.	Penamaan Mikroorganisme-Nomenklatur Sistem	69
4.6.	Biner	71
4.7.	Perkembangan Mutakhir Dalam Taksonomi Mikroba Ringkasan Dan Prospek.....	74
BAB 5	PREPARASI ANALISA SECARA KUALITATIF.....	75
5.1.	Pendahuluan.....	75
5.2.	Analisa Kadar Glukosa.....	75
5.3.	Analisa Kadar Ethanol.....	76
5.4.	Analisa Kadar Glukosa Sisa.....	77
BAB 6	ANALISA KUANTITATIF DENGAN KROMATOGRAFI KINERJA TINGGI.....	81
6.1.	Pendahuluan.....	81
6.2.	Teori Dasar HPLC.....	83
6.3.	Instrumentasi HPLC.....	95
6.4.	Pelaksanaan Analisis Dengan HPLC.....	106
6.5.	Metode Analisis HPLC.....	108
6.6.	Gangguan Pada HPLC Dan Cara Penanganannya..	109
6.7.	Contoh Analisa.....	111
6.8.	Latihan Soal.....	113

DAFTAR PUSTAKA.....	117
BIODATA PENULIS.....	123

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

Bab 1

PENDAHULUAN

Pokok Bahasan :

Ketergantungan Indonesia terhadap minyak bumi sudah saatnya dikurangi, bahkan dihilangkan. Untuk menanggulangnya diperlukan bahan baku alternatif yang dapat menghasilkan ethanol, sebagai bahan substitusi atau campuran bahan bakar kendaraan, peningkat oktan, dan bensin ethanol (gasohol).

Indonesia mempunyai iklim yang mempermudah tumbuhnya rumput gajah dan bambu, sehingga ketersediaan rumput gajah dan bambu dapat secara kontinyu melimpah. Rumput gajah merupakan salah satu tanaman yang kurang dimanfaatkan sedangkan bambu adalah tanaman yang selama ini banyak digunakan untuk bahan kerajinan. Dewasa ini rumput hanya digunakan sebagai makanan ternak. Terkadang rumput gajah juga dianggap sebagai tanaman pengganggu, tetapi rumput yang mempunyai kadar selulosa ini dapat digunakan sebagai salah satu bahan penghasil ethanol, begitu juga dengan bambu.

Tujuan Instruksional , pembaca diharapkan :

1. Memahami tentang ketergantungan Indonesia terhadap minyak bumi
2. Memahami bahwa bambu dapat digunakan sebagai salah satu bahan penghasil ethanol
3. Memahami bahwa rumput gajah dan bambu mempunyai kadar selulosa tinggi.

1.1. Latar Belakang

Pertambahan jumlah penduduk yang disertai dengan peningkatan kesejahteraan masyarakat berdampak pada makin meningkatnya kebutuhan akan sarana transportasi dan aktivitas industri. Hal ini tentu saja

menyebabkan kebutuhan akan bahan bakar cair juga semakin meningkat. Menurut data *Automotive Ethanol Oil*, konsumsi bahan bakar minyak di Indonesia sejak tahun 1995 telah melebihi produksi dalam negeri. Diperkirakan dalam kurun waktu 10-15 tahun kedepan, cadangan minyak Indonesia akan habis. Perkiraan ini terbukti dengan seringnya terjadi kelangkaan BBM di beberapa daerah di Indonesia.

Ketergantungan Indonesia terhadap minyak bumi sudah saatnya dikurangi, bahkan dihilangkan. Program Pemerintan pada tahun 2025 tentang pemakaian ethanol sebagai bahan bakar, produksi ethanol hanya tergantung pada bahan baku tetes merupakan limbah pabrik gula, keberadaan pabrik gula di Indonesia tidak berkembang. Tetes yang dihasilkan tidak memenuhi kuantitas, sehingga perlu pengembangan bahan baku alternatif untuk produk ethanol. Sejak Menteri Negara Riset dan Teknologi me-launching Bahan bakar Gasohol BE-10 pada akhir Januari 2005, dimana bahan baku yang digunakan untuk pembuatan ethanol dari ketela pohon dan jagung, mempunyai harga jual yang sangat berfluktuatif, sehingga harga jualnya jauh lebih mahal dari bahan bakar minyak (BBM).

Pemerintah melakukan impor BBM, hal ini menunjukkan kebutuhan BBM nasional cukup besar sedangkan produksi dalam negeri tidak mencukupi sehingga sering terjadi kelangkaan BBM dan harga BBM menjadi sangat mahal, dan harga kebutuhan pokok ikut mahal, yang mengakibatkan terganggunya sektor ekonomi. Masalah ini dapat diatasi dengan mengem-bangkan sumber energi alternatif berbahan baku minyak nabati.

1.2. Bioethanol dan Ethanol

Ethanol atau *ethyl alcohol* kadang disebut juga ethanol spiritus. Ethanol digunakan dalam beragam industri seperti campuran untuk minuman keras seperti sake atau gin, bahan baku farmasi dan kosmetika, dan campuran bahan bakar kendaraan, peningkat oktan, dan bensin ethanol (gasohol). Sampai saat ini konsumsi ethanol dunia sekitar 63 persen untuk bahan bakar, terutama di Brazil, Amerika Utara, Kanada, Uni Eropa, dan Australia. Di Asia, konsumsi terbesar ethanol adalah untuk minuman keras. Jepang dan Korea Selatan adalah kon-

sumen ethanol terbesar untuk industri ini. Fungsi ethanol sebagai campuran bahan bakar kendaraan memiliki prospek bagus karena harga minyak mentah makin tinggi. Ethanol ini berfungsi sebagai penambah volume BBM, sebagai peningkat angka oktan, dan sebagai sumber oksigen untuk pembakaran yang lebih bersih pengganti methyl tertiary-butyl ether (MTBE)

Karena ethanol mengandung 35 persen oksigen, ia dapat meningkatkan efisiensi pembakaran. Ethanol juga ramah lingkungan karena emisi gas buangnya rendah kadar karbon monoksidanya, nitrogen oksida, dan gas-gas rumah kaca yang menjadi polutan. Ethanol juga mudah terurai dan aman karena tidak mencemari lingkungan.

Ethanol dapat dibuat dari berbagai bahan hasil pertanian, dengan demikian Ethanol sering disebut Bioethanol. Secara umum bahan tersebut dibagi dalam tiga golongan yaitu : bahan yang mengandung turunan gula sebagai golongan pertama antara lain molase, gula tebu, gula bit dan sari buah yang umumnya adalah sari buah angur. Golongan kedua adalah bahan-bahan yang mengandung pati seperti biji-bijian (gandum, misalnya), kentang, tapioka. Jenis atau golongan yang terakhir adalah bahan yang mengandung selulosa seperti kayu, bambu dan beberapa limbah pertanian. Selain ketiga jenis bahan tersebut diatas khususnya ethanol dapat dibuat juga dari bahan bukan asli pertanian tetapi dari bahan yang merupakan hasil proses lain, sebagai contohnya adalah etilen.

Bahan-bahan yang mengandung monosakarida ($C_6H_{12}O_6$) sebagai glukosa langsung dapat difermentasi menjadi ethanol. Akan tetapi disakarida pati, atau pun karbohidrat kompleks harus dihidrolisa terlebih dahulu menjadi komponen sederhana, monosakarida. Oleh karena itu, agar tahap proses fermentasi dapat berjalan secara optimal, bahan tersebut harus mengalami perlakuan pendahuluan sebelum masuk ke dalam proses fermentasi.

Disakarida seperti gula pasir ($C_{12}H_{22}O_{11}$) harus dihidrolisa menjadi glukosa. Polisakarida seperti selulosa harus diubah terlebih dahulu menjadi glukosa. Terbentuknya glukosa berarti proses pendahuluan telah berakhir dan bahan-bahan selanjutnya siap untuk difermentasi. Secara kimiawi proses fermentasi dapat berjalan cukup panjang, karena terjadi

Teori Dan Aplikasi ...

suatu deret reaksi yang masing-masing dipengaruhi oleh enzim-enzim khusus.

Hasil atau produk yang diinginkan dari fermentasi glukosa adalah ethanol, mempunyai rumus dasar C_2H_5OH dan ethanol mempunyai sifat-sifat fisik sebagai berikut :

1. Cairan tidak berwarna
2. Berbau khas, menusuk hidung
3. Mudah menguap
4. Titik didih $78,32^{\circ}C$
5. Larut dalam air dan eter
6. Densitas pada $15^{\circ}C$ adalah 0,7937
7. Spesifik panas pada $20^{\circ}C$ adalah $0,579 \text{ cal/gr}^{\circ}C$
8. Panas pembakaran pada keadaan cair adalah 328 Kcal
9. Viskositas pada $20^{\circ}C$ adalah 1,17 cp
10. Flash point adalah sekitar $70^{\circ}C$

Sifat-sifat kimia ethanol :

1. Berat molekul adalah 46,07 gr/mol
 2. Terjadi dari reaksi fermentasi monosakarida
 3. Bereaksi dengan asam asetat, asam sulfat, asam nitrit, asam ionida.
- (Faith and Keyes, 1957 ; Soebijanto, 1986)

Didalam perdagangan dikenal tingkat–tingkat kualitas ethanol sebagai berikut :

- a. Alkohol teknis ($96,5^{\circ}GL$)
Digunakan terutama untuk kepentingan industri. Sebagai pelarut organik, bahan bakar, dan juga sebagai bahan baku ataupun untuk produksi berbagai senyawa organik lainnya.
- b. Spiritus ($88^{\circ}GL$)
Bahan ini biasa digunakan sebagai bahan bakar untuk alat pemanas ruangan dan alat penerangan.
- c. Alkohol absolute ($99,7 - 99,8^{\circ}GL$)
Banyak digunakan dalam pembuatan sejumlah besar obat–obatan dan juga sebagai bahan pelarut atau sebagai bahan didalam pem-buatan senyawa – senyawa lain pada skala laboratorium.

d. Alkohol murni (96,0 – 96,5 °GL)

Alkohol jenis ini terutama digunakan untuk kepentingan farmasi dan konsumsi (minuman keras dan lain – lain) (Soebijanto, 1986).

Kebutuhan ethanol di dunia makin meningkat, hal ini dapat juga dilihat pada kebutuhan nasional sebagai berikut :

Tabel 1.1. Jumlah Kebutuhan Ethanol Nasional

Tahun	Kebutuhan Ethanol (Liter)
2001	25.251.852
2002	21.076..317
2003	34.063.193
2004	230.613.100

(BPS, Surabaya)

1.3. Prospek Bambu sebagai Sumber Bahan Baku Bioethanol

Tanaman Bambu

Bambu merupakan tanaman yang sudah dikenal luas oleh masyarakat Indonesia yang dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan perkakas dapur, bahan pembuatan aneka keperluan pertanian, bahan bangunan, bahan kerajinan dan lain-lain. Dapat juga dijadikan bioetanol sebagai alternatif dalam krisis energi pada saat ini. Oleh karena itu, perlu adanya budidaya bambu untuk dapat meningkatkan jumlah bambu yang akan diolah menjadi bioetanol. Unsur utama dari batang bambu adalah selulosa, hemiselulosa dan lignin (Liese, W. and Grover, P.N.1961). Memanfaatkan bambu sebagai sumber bioetanol selulosa tentunya jauh lebih baik daripada hanya menjadi polusi (Mosier, Wyman, Dale, Elander, Lee, & Holtzapple. 2005).



Gambar 1.1. Bambu Ori (Betung)

Klasifikasi Tanaman Bambu (Anonim.2013) :

- Kingdom : Plantae
- Divisio : Magnoliophyta
- Classis : Magnoliopsida
- Sub classis : Commelinidae
- Ordo : Cyperales
- Familia : Poaceae
- Genus : Bambusa
- Species : Bambusa sp

Tanaman bambu sebagai salah satu bahan alternatif produksi bioetanol didasarkan atas kandungan selulosa yang berkisar antara 42,4 % - 53,6% , lignin berkisar antara 19,8% - 26,6%, dan kadar pentosan 1,24% - 3,77%, tanaman bambu merupakan jenis tanaman yang sangat mudah tumbuh dan dapat tumbuh diberbagai tempat khususnya pada daerah-daerah yang berhawa dingin. Selulosa adalah polimer β -glukosa dengan ikatan β -1, 4 diantara satuan glukosanya. Selulosa berfungsi sebagai bahan struktur dalam jaringan tumbuhan dalam bentuk campuran polimer homolog dan biasanya disertai polisakarida lain dan lignin dalam jumlah yang beragam. Molekul selulosa memanjang dan kaku, meskipun dalam larutan. Gugus hidroksil yang menonjol dari rantai dapat membentuk ikatan hidrogen dengan mudah, mengakibatkan

kekristalan dalam batas tertentu. Derajat kekristalan yang tinggi menyebabkan modulus kekenyalan sangat meningkat dan daya regang serat selulosa menjadi lebih besar dan mengakibatkan makanan yang mengandung selulosa lebih liat. Selulosa yang merupakan polisakarida terbanyak di bumi dapat diubah menjadi glukosa dengan cara hidrolisis asam (Groggin, 1985).

Lignoselulosa

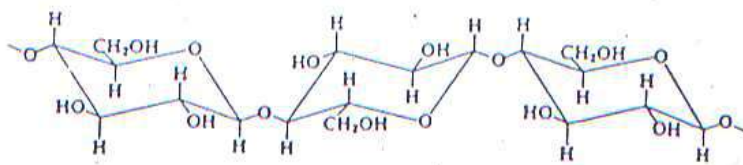
Bahan lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Ketersediaannya yang cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan, menjadikan bahan ini berpotensi sebagai salah satu sumber energi melalui proses konversi, baik proses fisika, kimia maupun biologis. Salah satu proses konversi bahan lignoselulosa yang banyak diteliti adalah proses konversi lignoselulosa menjadi etanol yang selanjutnya dapat digunakan untuk mensubstitusi bahan bakar bensin untuk keperluan transportasi. Ada beberapa faktor yang mendorong makin intensifnya dilakukan penelitian pemanfaatan bahan lignoselulosa menjadi sumber energi, dalam hal ini etanol. Pertama, kebutuhan dan konsumsi energi terus meningkat dari tahun ke tahun, sementara sumber daya alam yang dapat menghasilkan energi makin terkuras karena sebagian besar sumber energi saat ini berasal dari sumber daya alam yang tidak terbarukan, seperti minyak, gas, dan batu bara. Kedua, bioetanol memiliki karakteristik yang lebih baik dibandingkan dengan bensin karena dapat meningkatkan efisiensi pembakaran (Hambali et al. 2007)

Selulosa

Selulosa dan pati merupakan material yang diperlukan untuk proses pembuatan etanol, selulosa mendekati sama dengan pati, yaitu senyawa polimer dari glukosa, tetapi selulosa dan pati berbeda karena memiliki gugus ikatan C yang berbeda, ikatan polimer selulosa terjadi pada gugus C-beta sedangkan pati memiliki ikatan polimer pada gugus C-alfa. Selulosa berfungsi sebagai bahan struktur dalam jaringan tumbuhan dalam bentuk campuran polimer homolog dan biasanya disertai polisakarida lain

dan lignin dalam jumlah yang beragam, molekul selulosa memanjang dan kaku, meskipun dalam larutan (Groggins, 1985).

Salah satu bahan yang mengandung selulosa yaitu bambu. Persentase selulosa pada bambu yaitu 42,4% – 53,6%. Persentase komponen lain yang terkandung dalam batang bambu adalah lignin (19,8% - 26,6%), pentosan (1,24% - 3,77%), zat ekstraktif (4,5% - 9,9%), air (15% - 20%), abu (1,24% - 3,77%), dan SiO₂ (0,1% - 1,78%). Persentase selulosa yang lumayan besar ini menjadikan bambu sebagai salah satu sumber bioetanol selulosa (Fatriasari, W., & Hermiati, E. 2008)



Gambar 1.2. Rumus Bangun Selulosa

Hemiselulosa

Hemiselulosa merupakan istilah umum bagi polisakarida yang larut dalam alkali. Hemiselulosa sangat dekat asosiasinya dengan selulosa dalam dinding sel tanaman. Lima gula netral, yaitu glukosa, mannosa, dan galaktosa (heksosan) serta xilosa dan arabinosa (pentosan) merupakan konstituen utama hemiselulosa (Fengel dan Wegener 1984). Berbeda dari selulosa yang merupakan homopolisakarida dengan monomer glukosa dan derajat polimerisasi yang tinggi (10.000–14.000 unit), rantai utama hemiselulosa dapat terdiri atas hanya satu jenis monomer (homopolimer), seperti xilan, atau terdiri atas dua jenis atau lebih monomer (heteropolimer), seperti glukomannan. Rantai molekul hemiselulosa pun lebih pendek daripada selulosa. (Fengel dan Wegener 1984; Howard et.al. 2003). Hemiselulosa merupakan suatu kesatuan yang membangun komposisi serat dan mempunyai peranan yang penting karena bersifat hidrofilik sehingga berfungsi sebagai perekat antar selulosa yang menunjang kekuatan fisik serat. Kehilangan hemiselulosa akan menyebabkan terjadinya lubang diantara fibril dan kurangnya ikatan antar serat (Anindyawati, Trisanti. 2010)

Lignin

Lignin adalah bagian utama dari dinding sel tanaman yang merupakan polimer terbanyak setelah selulosa (Anindyawati, Trisanti, 2010) dan merupakan pelindung selulosa dan hemiselulosa. Lignin dapat mengganggu proses hidrolisa karena akan menghambat aktivitas enzim di dalam ragi dalam pengkonversian gula sederhana menjadi etanol (Wiratmaja, Kusuma, & Winaya, 2011) Kandungan lignin dalam kayu daun jarum lebih tinggi daripada dalam kayu daun lebar. Di samping itu, terdapat beberapa perbedaan struktur lignin dalam kayu daun jarum dan dalam kayu daun lebar (Fengel, D. and Wegener, G.1984)

Glukosa

Glukosa adalah monosakarida yang paling banyak terdapat di alam sebagai produk dari proses fotosintesis. Dalam bentuk bebas terdapat di dalam buah-buahan, tumbuh-tumbuhan, madu, darah. Dalam bentuk ikatan terdapat sebagai glikosida di dalam tubuh binatang, sebagai disakarida, dan polisakarida di dalam tubuh tumbuhan. Glukosa juga dapat dihasilkan melalui hidrolisis polisakarida atau disakarida, dengan asam atau enzim. Sebagai aldoheksosa, glukosa memiliki 6 atom karbon di dalam rantai molekulnya. Salah satu ujung rantai tersebut merupakan gugus aldehyd. Atom-atom karbon nomor 2 sampai nomor 5 di dalam rantai adalah gugus chiral. Dengan demikian terdapat 16 kemungkinan konfigurasi isomer pada glukosa. Semua konfigurasi isomer tersebut telah dikenal sebagian terdapat bebas di alam, sebagian yang lain harus dibuat secara sintesis. Tidak kurang dari 32 macam organisme yang telah diteliti dapat menghasilkan glukosa isomerase diantaranya, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Escherchia*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Paralactobacterium*, *Leuconostoc*, dan *Streptomyces* (Soebijanto, 1986).

Ethanol

Hasil yang diinginkan dari fermentasi glukosa adalah ethanol, dimana ethanol mempunyai rumus dasar C_2H_5OH dan mempunyai sifat-sifat fisik sebagai berikut:

Teori Dan Aplikasi ...

- a. Cairan tidak berwarna
 - b. Berbau khas, menusuk hidung
 - c. Mudah menguap
 - d. Titik didih 78,32 °C
 - e. Larut dalam air dan ether
 - f. Densitas pada 15 °C adalah 0,7937
 - g. Spesifik panas pada 20 °C adalah 0,579 cal/gr °C
 - h. Panas pembakaran pada keadaan cair adalah 328 Kcal
 - i. Viskositas pada 20 °C adalah 1,17 cp
 - j. Flash point adalah sekitar 70 °C
- (Faith, 1957 dan Soebijanto, 1986).

Sifat-sifat kimia ethanol :

1. Berat molekul adalah 46,07 gr/mol
 2. Terjadi dari reaksi fermentasi monosakarida
 3. Bereaksi dengan asam asetat, asam sulfat, asam nitrit, asam ionida
- (Faith, 1957 dan Soebijanto, 1986).

Di dalam perdagangan dikenal tingkat-tingkat kualitas ethanol sebagai berikut (Soebijanto, 1986) :

- a. Alkohol teknis (96,5 °GL). Digunakan terutama untuk kepentingan industri. Sebagai pelarut organik, bahan bakar, dan juga sebagai bahan baku ataupun antara produksi berbagai senyawa organik lainnya.
- b. Spiritus (88 °GL). Bahan ini biasa digunakan sebagai bahan bakar untuk alat pemanas ruangan dan alat penerangan.
- c. Alkohol absolute (99,7 - 99,8 °GL). Banyak digunakan dalam pembuatan sejumlah besar obat-obatan dan juga sebagai bahan pelarut atau sebagai bahan antara didalam pembuatan senyawa-senyawa lain skala labo-ratorium.
- d. Alkohol murni (96,0 - 96,5 °GL). Alkohol jenis ini terutama digunakan untuk kepentingan farmasi dan konsumsi (minuman keras dan lain-lain).

Proses Kimia Produksi Bioethanol Dari Bambu

Bahan-bahan yang mengandung monosakarida ($C_6H_{12}O_6$) seba-

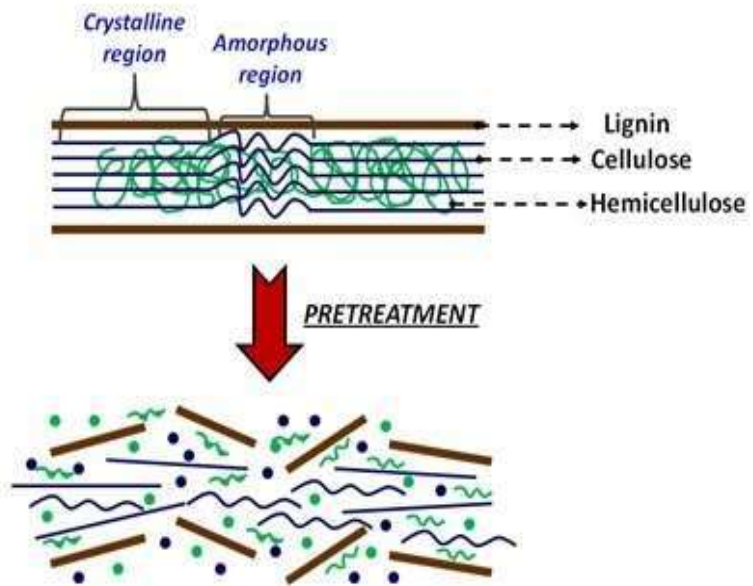
gai glukosa langsung dapat difermentasi menjadi ethanol. Akan tetapi disakarida pati, karbohidrat kompleks harus dihidrolisa terlebih dahulu menjadi komponen sederhana menjadi monosakarida. Tahap proses fermentasi dapat berjalan secara optimal, bahan tersebut harus mengalami perlakuan penda-huluan sebelum masuk ke dalam proses fermentasi (Sari, dkk, 2012). Disakarida seperti gula pasir ($C_{12}H_{22}O_{11}$) harus dihidrolisa menjadi glukosa, polisakarida seperti selulosa harus diubah terlebih dahulu menjadi glukosa. Terbentuknya glukosa berarti proses pendahuluan telah berakhir dan bahan-bahan selanjutnya siap untuk difermentasi. Secara kimiawi proses fermentasi dapat berjalan cukup panjang, karena terjadi suatu deret reaksi yang masing-masing dipengaruhi oleh enzim-enzym khusus (Sari, dkk, 2013).

1.4. Pretreatmen Bambu

Bahan-bahan lignoselulosa umumnya terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin. Selulosa secara alami diikat oleh hemiselulosa dan dilindungi oleh lignin (Iranmahboob, 2002). Oleh karena itu, proses pretreatmen merupakan tahapan proses yang sangat penting yang dapat mempengaruhi produksi glukosa maupun xilosa sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Pretreatmen bertujuan untuk memecah ikatan lignin (delignifikasi), menghilangkan kandungan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan. Rusaknya struktur kristal selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa. Hemiselulosa dan selulosa pada struktur bahan lignoselulosa terikat (diselubungi) oleh lignin (Prawitwong, dkk, 2012)

Pretreatmen merupakan kunci penting dan dinilai sebagai salah satu langkah proses yang mahal pada proses konversi biomassa menjadi bioetanol, sehingga sangat potensial untuk dikembangkan agar lebih efisien dan ekonomis (Lee dkk.,1994; Lynd dkk.,1996). Pretreatmen ini dimaksudkan untuk meningkatkan kemampuan area permukaan (porositas) selulosa sehingga dapat meningkatkan konversi selulosa menjadi glukosa (Sharma dkk., 2002). Oleh karena itu pretreatmen diperlukan untuk menghilangkan lignin dan hemiselulosa, menurunkan tingkat kekristalan selulosa sehingga meningkatkan fraksi amorph

selulosa, dan meningkatkan porositas material (Sánchez dan Cardona, 2007; Zhu dkk., 2008; Hsu dkk., 2010).



Gambar 1.3. Proses Pretreatmen Bambu

1.5. Proses Delignifikasi

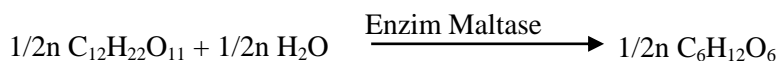
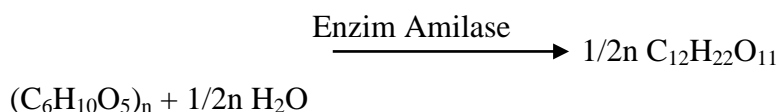
Cadangan bahan bakar fosil Indonesia bahkan dunia sangat terbatas dan lambat laun akan semakin menipis, oleh karena itu sangat tidak bijaksana jika bahan bakar hanya bergantung dari fosil saja. Banyak pihak memikirkan cara lain untuk mendapatkan bahan bakar selain dari fosil yaitu melalui energi alternatif terbarukan. Salah satu bentuk energi terbarukan yaitu bioetanol yang dapat diproduksi dari tumbuhan. Oleh karena itu dikembangkan produksi bioetanol dengan menggunakan bahan yang mengandung selulosa. Salah satu bahan yang mengandung selulosa yaitu bambu.

Delignifikasi bambu masih jarang diteliti sehingga belum dapat disimpulkan delignifikator mana yang akan menghasilkan kadar lignin paling minimum. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang delignifikasi bambu guna mendapatkan hasil berupa lignin minimum

sehingga dapat mengoptimalkan tahap selanjutnya pada pembuatan bioetanol. Pada beberapa penelitian, delignifikasi umumnya menggunakan NaOH dan H₂SO₄. Delignifikasi bertujuan untuk mengurangi kadar lignin di dalam bahan berlignoselulosa. Delignifikasi akan membuka struktur lignoselulosa agar selulosa menjadi lebih mudah diakses. Proses delignifikasi akan melarutkan kandungan lignin di dalam bahan sehingga mempermudah proses pemisahan lignin dengan serat (Sumada, dkk., 2011)

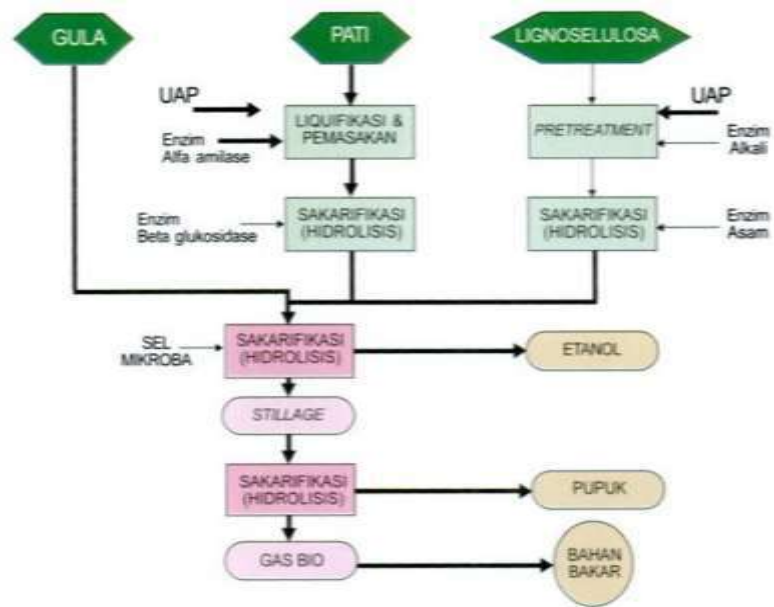
Proses Hidrolisis

Pati merupakan komponen yang lebih kompleks daripada disakarida. Sebelum difermentasi, pati harus dipecah dengan menggunakan enzim amilase (banyak terdapat dalam gandum yang berkecambah) menjadi komponen disakarida yaitu maltosa. Dengan menggunakan enzim lain yaitu maltase, maltosa akan dihidrolisa menjadi glukosa (Gumbira, 1987).



Proses hidrolisis dipengaruhi dengan beberapa faktor, antara lain jumlah kandungan karbohidrat pada bahan baku, pH operasi atau konsentrasi asam yang digunakan, waktu hidrolisis, suhu hidrolisis dan katalisator (Sari, dkk, 2013).

Diagram alir pembuatan bioetanol terdapat pada gambar di bawah ini :



(Sumber : Prihandana dkk, 2007)

Gambar 1.4. Diagram alir proses pembuatan bioetanol dari bahan baku gula, pati, dan ligno-selulosa

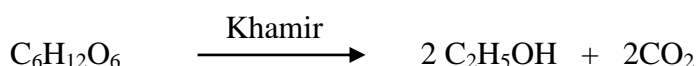
Proses Fermentasi

Dalam pembentukan alkohol melalui fermentasi, peran mikrobiologi sangat besar dan biasanya mikrobiologi yang digunakan untuk fermentasi mempunyai beberapa syarat sebagai berikut :

1. Mempunyai kemampuan untuk memfermentasi karbohidrat yang cocok secara cepat.
2. Bersifat membentuk flakulasi dan sedimentasi.
3. Mempunyai genetik yang stabil (tidak mudah mengalami mutasi).
4. Toleran terhadap alkohol yang tinggi (antara 14 – 15 %).
5. Mempunyai sifat regenerasi yang cepat (Kartika, 1992)

Minuman beralkohol yang dihasilkan tanpa distilasi (hasil fermentasi) biasanya mempunyai kadar alkohol antara 3–18 %, untuk mempertinggi

kadar alkohol dalam produk sering kali hasil fermentasi di distilasi dan kadar alkohol yang dihasilkan antara 29–50 % (Sari, dkk, 2006). Prinsipnya reaksi proses pembentukan ethanol dengan fermentasi sebagai berikut :



Pada hasil fermentasi biasanya terbentuk larutan alkohol yang encer, karena sel-sel khamir akan mati bila kadar ethanol melebihi 12–15 %. (Gumbira Sa'id, 1987). Hasil fermentasi yang ideal adalah 51,1 % ethanol dan 48,9 % karbondioksida. Hasil fermentasi alkohol yang optimum dinyatakan dalam % glukosa yang difermentasi diantaranya : Ethyl alkohol 48,8 %, Karbondioksida 46,6 %, Gliserol 3,3 %, Asam suksinat 0,6 %, Selulosa dan sebagainya 1,2% (Soebijanto, 1986).

Faktor-faktor yang mempengaruhi dalam proses fermentasi antara lain pH yang baik untuk fermentasi antara pH 4 - 5, karena asam laktat baik untuk pertumbuhan ragi, tetapi keburukannya dapat tumbuh bakteri asam butirir yang dapat merugikan fermentasi dari ragi (Bahri, 1987). Waktu yang diperlukan untuk fermentasi tergantung pada temperatur, konsentrasi gula, pada umumnya waktu yang diperlukan antara 36-50 jam (Bahri, 1987). Pada umumnya suhu yang baik untuk proses fermentasi antara 25-30 °C, Semakin rendah suhu fermentasi akan semakin tinggi alkohol yang di hasilkan. Hal ini dikarenakan pada suhu yang rendah fermentasi akan lebih lengkap dan kehilangan alkohol karena terbawa oleh gas karbondioksida akan lebih sedikit (Agus, 2002).

Faktor–faktor yang mempengaruhi fermentasi :

1. Suhu

Suhu optimum untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan adalah 28 °C – 30 °C. Pada waktu fermentasi terjadi kenaikan panas karena reaksi berjalan eksoterm. Untuk mencegah agar suhu fermentasi tidak naik, perlu pendinginan agar dipertahankan 28 °C – 30 °C (Hidayat, 2006).

2. Keasaman (pH)

Untuk fermentasi alkohol, khamir memerlukan media dengan sua-

sana asam, yaitu antara pH 4,8 – 5,0. Pengaturan pH dapat dilakukan dengan penambahan asam jika substrat alkalis atau dengan basa jika substrat asam (Hidayat, 2006).

3. Nutrisi

Dalam kegiatannya khamir yang melakukan proses fermentasi alkohol memerlukan penambahan nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan (Hidayat, 2006), yaitu :

- a. Unsur C, ada faktor karbohidrat
- b. Unsur N, penambahan pupuk yang mengandung nitrogen misal ZA, urea, ammonia, dan sebagainya.
- c. Unsur P, dengan penambahan pupuk fosfat, misal NPK, TSP, DSP, dan sebagainya.
- d. Mineral – mineral.
- e. Vitamin – vitamin.

4. Konsentrasi gula

Kandungan gula akan sangat mempengaruhi proses fermentasi, kandungan gula optimum yang diberikan untuk fermentasi adalah 25%, untuk permulaan kadar gula yang digunakan adalah 16%.

5. Konsentrasi starter

Volume starter yang baik untuk melakukan fermentasi adalah 1/10 bagian dari volume substrat (Sari, 2009).

6. Waktu fermentasi

Pada umumnya waktu yang dibutuhkan untuk fermentasi antara 36 – 50 jam. Waktu optimum yang dibutuhkan untuk fermentasi adalah ± 7 hari. Apabila lebih dari 7 hari akan menyebabkan semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan sehingga terjadi kematian pada bakteri (Yudy D., 2011).

Proses Distilasi Batch

Distilasi batch biasanya dilakukan secara batch dalam bejana distilasi, uap yang terbentuk (V_m) segera diembunkan dan distilat (D) yang terjadi dipisahkan dari liquida yang tertinggal dalam bejana (W). Karena uap akan lebih banyak mengandung komponen yang lebih *volatile* maka kadar residu yang lebih *volatile* makin lama makin kecil, dapat persamaan sebagai berikut:

$$V_m = - d/dt (W \cdot x_w) \dots\dots\dots (1.1)$$

$$V_m = - W \cdot dx_w/dt - x_w \cdot dW/dt ; \quad V_m = D \cdot y_D$$

Pengurangan kecepatan aliran dalam *still-pot* = kecepatan aliran keluar

$$W \cdot dx_w/dt + x_w \cdot dW/dt = - D \cdot y_D$$

$$\frac{dx_w}{dt} = (y_D - x_w) \frac{dW}{W dt} \dots\dots\dots (1.2)$$

Dalam pemisahan sistem multikomponen, diasumsikan bahwa liquida bercampur sempurna dimana $x_w = x_i$ dan $y_D = y_i$, maka (Henley dan Seader, 1998) :

$$\frac{dx_i}{dt} = (y_i - x_i) \frac{dW}{W dt} ; \quad \frac{dx_i}{(y_i - x_i)} = \frac{dW}{W} \dots\dots\dots (1.3)$$

Dimana: komposisi liquida di *bottom* (x_w), komposisi liquida komponen i (x_i), komposisi uap di distilat (y_D) dan komposisi uap komponen i (y_i).

Dengan kondisi awal : $x = x_0$ dan $W = W_0$, kemudian diintegrasikan menjadi:

$$\int_{x_0}^x \frac{dx_i}{(y_i - x_i)} = \int_{W_0}^W \frac{dW}{W} = \ln \left(\frac{W}{W_0} \right) ; \quad \frac{dx_i}{(y_i - x_i)} = d \ln \left(\frac{W}{W_0} \right)$$

Didefinisikan *dimensionless* waktu (ξ) adalah sebagai berikut:

$$\xi = \ln \left(\frac{W_0}{W} \right) \dots\dots\dots (1.4)$$

Dimana, ξ = bilangan tak berdimensi yang tergantung pada waktu,

$$\text{disubstitusi sehingga diperoleh Persamaan: } \frac{dx_i}{(y_i - x_i)} = d\xi \dots\dots (1.5)$$

Persamaan diatas merupakan model *Differential-Algebraic-Equations* (DAEs) untuk distilasi batch sederhana sistem multi komponen, dengan asumsi tidak membentuk dua phase liquida. Persamaan diatas dengan *forward-finite-difference*, akan diperoleh komposisi liquida di *bottom* ($x_{i,j+1}$) sebagai fungsi $\Delta\xi$, sehingga didapat sebagai berikut :

$$x_{i,j+1} = x_{i,j} + (y_{i,j} - x_{i,j}) \Delta\xi \dots\dots\dots (1.6)$$

Dimana komposisi liquida mula-mula di *bottom* ($x_{i,j}$) dan $\Delta\xi$ ditentukan, sedangkan komposisi uap ($y_{i,j}$) dihitung menggunakan Persamaan BUBL T (Henley dan Seader, 1998).

1.6. Pendekatan Teoretik

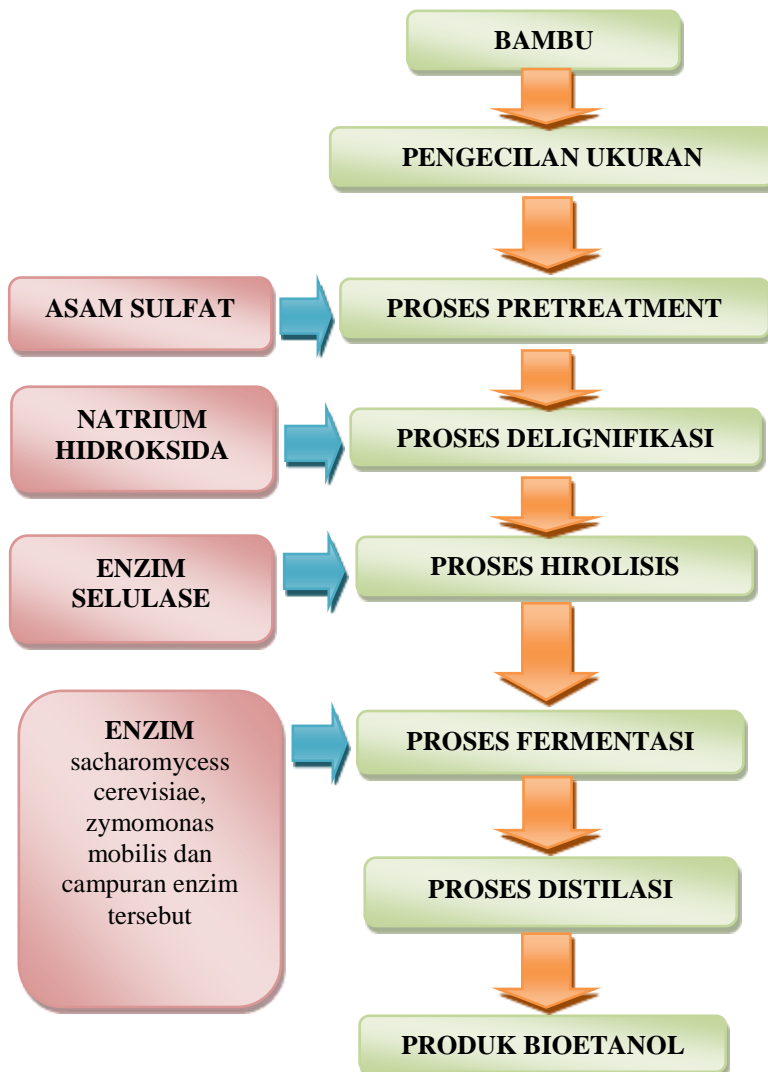
Penelitian Optimalisasi Produksi Bioetanol dari Bambu dengan Proses Hidrolisis, Fermentasi dan Distilasi Batch direncanakan dilaksanakan dalam 2 (dua) tahun, yaitu penelitian pada tahun pertama mengkaji kualitas bambu, proses pretreatment dengan asam sulfat (H_2SO_4), delignifikasi dengan natrium hidroksida (NaOH) dan optimalisasi proses hidrolisa selulosa dengan enzim selulase, pada tahun kedua optimalisasi proses fermentasi glukosa dengan enzim *sacharomycess cerevisiae*, *zymomonas mobilis* dan campuran bakteri tersebut dan proses produksi bioetanol dengan menggunakan distilasi batch.

Tabel 1.2 Penelitian topik energi yang akan dikerjakan serta luaran

No	Tahun Penelitian	Kegiatan Penelitian	Indikator Capaian Terukur
1	Tahun Pertama	<ol style="list-style-type: none"> Proses Pretreatment dengan asam sulfat (H_2SO_4) Proses Delignifikasi dengan natrium hidroksida (NaOH) Proses Hidrolisis selulosa dengan enzim selulase 	<ol style="list-style-type: none"> Optimasi proses pretreatment bambu dengan asam sulfat Optimasi proses delignifikasi bambu dengan natrium hidroksida Optimasi proses hidrolisis selulosa dengan enzim selulase Seminar dan Jurnal Internasional HKI jenis Paten
2	Tahun Kedua	<ol style="list-style-type: none"> Proses fermentasi gula dengan enzim <i>sacharomycess cerevisiae</i>, <i>zymomonas mobilis</i> dan campuran bakteri tersebut Produksi bioetanol berbahan baku bambu dalam skala mini plant dengan distilasi batch 	<ol style="list-style-type: none"> Optimasi proses fermentasi gula dengan enzim <i>sacharomycess cerevisiae</i>, <i>zymomonas mobilis</i> dan campuran bakteri tersebut Rancangan proses produksi bioetanol berbahan baku bambu Seminar dan Jurnal Internasional Buku Ajar Teknologi Tepat Guna (TTG)

1.7. Blok Diagram dan Uraian Kegiatan Penelitian

Penelitian produksi bioetanol berbahan baku BAMBU merupakan penelitian laboratorium dalam skala mini plant, metodologi dan sistematika pelaksanaan penelitian seperti ditunjukkan dalam blok diagram berikut ini.



Gambar 4.1. Blok diagram produksi bioetanol berbahan baku bambu

Penelitian Pada Tahun Pertama (I)

Penelitian pada tahun pertama meliputi :

- a. Proses fisik yaitu merubah bambu batangan menjadi dalam bentuk serbuk dengan ukuran 100 mesh, hal ini dimaksudkan untuk mempercepat proses pretreatmen, delignifikasi maupun hidrolisa.
- b. Analisis kualitas bambu dimaksudkan untuk mengetahui kadar selulosa, lignin, bahan terlarut dan pentosa awal.
- c. Proses pretreatmen dengan asam sulfat (H_2SO_4) dimaksudkan untuk menghilangkan (degradasi) senyawa pentosa dan bahan terlarut lainnya yang terkandung dalam bambu. Aspek yang dikaji meliputi :
 1. Perbandingan berat bambu terhadap volume pelarut (larutan H_2SO_4)
 2. Konsentrasi larutan asam sulfat
 3. Waktu proses pretreatmen
- d. Proses delignifikasi dengan natrium hidroksida (NaOH) dimaksudkan untuk mendegradasi senyawa lignin yang terkandung dalam bambu. Aspek yang dikaji meliputi:
 1. Perbandingan berat bambu terhadap volume pelarut (larutan NaOH)
 2. Konsentrasi larutan NaOH
 3. Waktu proses delignifikasi
- e. Hasil yang diperoleh merupakan optimasi proses pretreatmen terhadap bahan terlarut dan pentosa serta optimasi proses delignifikasi terhadap senyawa lignin, dan selulosa yang siap untuk dihidrolisis.
- f. Proses hidrolisis dengan enzim selulase dimaksudkan untuk merubah selulosa menjadi glukosa. Aspek yang dikaji meliputi :
 1. Perbandingan berat selulosa terhadap volume pelarut (larutan enzim selulase)
 2. Konsentrasi enzim selulase
 3. Waktu proses hidrolisa

Penelitian Pada Tahun Kedua (II)

Penelitian pada tahun kedua meliputi :

- a. Proses fermentasi dengan enzim *sacharomycess cerevisiae*,

zymomonas mobilis dan campuran enzim dimaksudkan untuk merubah glukosa menjadi bioetanol. Aspek yang dikaji meliputi :

1. Perbandingan berat (volume) setiap enzim yang diaplikasikan terhadap larutan glukosa
 2. Konsentrasi larutan glukosa
 3. Waktu fermentasi
- b. Hasil yang diperoleh merupakan optimasi proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa dan optimasi proses fermentasi glukosa menjadi bioetanol.
- c. Proses distilasi produk fermentasi dalam skala mini plant dimaksudkan untuk peningkatan konsentrasi (pemurnian) bioetanol. Aspek yang dikaji meliputi:
1. Konsentrasi umpan (kadar bioetanol) masuk kolom distilasi
 2. Waktu operasional kolom distilasi
- d. Hasil yang diperoleh merupakan rancangan menara (kolom) distilasi untuk pemurnian bioetanol berbahan baku bambu.

Lokasi penelitian dilakukan di dua tempat yaitu: di laboratorium Riset Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Pembangunan Nasional (UPN) "Veteran" Jawa Timur dan di laboratorium PT. MOLINDO.

Bambu merupakan tanaman yang sudah dikenal luas oleh masyarakat Indonesia yang dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan perkakas dapur, bahan pembuatan aneka keperluan pertanian, bahan bangunan, bahan kerajinan dan lain-lain. Bambu dapat juga dijadikan bioetanol sebagai alternatif bahan baku bioethanol, mengingat bahan baku untuk bioethanol sangat terbatas untuk mengatasi krisis energi pada saat ini. Oleh karena itu, perlu adanya budidaya bambu untuk dapat meningkatkan jumlah bambu yang akan diolah menjadi bioetanol. Hasil penelitian: "Optimalisasi Produksi Bioethanol dari Bambu dengan Proses Hidrolisis, Fermentasi dan Distilasi Batch", seperti berikut :

1.8. Kualitas bamboo



a)



b)



c)

Gambar 1.6. a) Bambu Daerah Gunung Arjuno Malang, b) Serat bambu, c) Serat bambu ukuran 100 mesh

Tabel 1.3. Kualitas Bambu Daerah Gunung Arjuno Malang

No	Parameter	Konsentrasi 1 (%)	Konsentrasi 2 (%)	Konsentrasi Rata-rata (%)
1	Selulosa	42,30	53,50	47,90
2	Lignin	19,80	26,60	23,20
3	Pentosan	1,24	3,77	4,39

Sumber : Laboratorium Riset FTI/TK UPN "Veteran" Jawa Timur

Berdasarkan hasil analisa laboratorium yang tercantum dalam Tabel 1.3. tersebut diatas, diketahui bahwa jumlah unsur pembentuk

bioethanol (selulose), untuk selulosa rata-rata sebesar 47,9 %, ini berarti jika seluruhnya bisa terhidrolisis secara sempurna diperoleh glukosa dalam jumlah yang besar. Dengan lepasnya lignin (23,2 %) dan pentosan (4,39 %) dalam bambu, akan diperoleh kadar glukosa yang tinggi, dan proses lanjutan dengan proses fermentasi akan diperoleh kadar alkohol yang tinggi. Mengingat komposisi selulosa yang tinggi pada bambu, maka proses hidrolisis diharapkan berjalan dengan sempurna, sehingga jumlah bambu terdegradasi secara sempurna menjadi selulosa sebesar 47,9 %.

1.9. Proses Pretreatment

Bahan-bahan lignoselulosa umumnya terdiri dari selulosa, hemiselulosa dan lignin, untuk memperoleh selulose yang tinggi dilakukan proses pretreatment, merupakan tahapan proses yang sangat penting yang dapat mempengaruhi produksi glukosa maupun xilosa sebagai bahan baku pembuatan bioetanol. Pretreatment bertujuan untuk memecah ikatan lignin (delignifikasi), menghilangkan kandungan lignin dan hemiselulosa, merusak struktur kristal dari selulosa serta meningkatkan porositas bahan, rusaknya struktur kristal selulosa akan mempermudah terurainya selulosa menjadi glukosa.

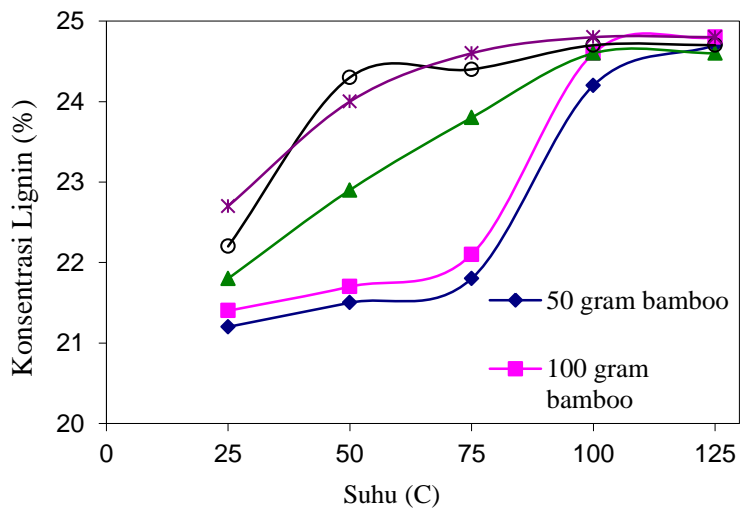
Proses pretreatment merupakan hal yang sangat penting dan salah satu proses yang mahal pada proses konversi biomassa menjadi bioetanol, sehingga sangat potensial untuk dikembangkan, supaya diperoleh bioethanol yang lebih efisien dan ekonomis (Lee dkk.,1994; Lynd dkk.,1996). Proses pretreatment untuk meningkatkan area permukaan (porositas) selulosa, sehingga dapat meningkatkan konversi selulosa menjadi glukosa (Sharma dkk., 2002). Oleh karena itu pretreatment diperlukan untuk menghilangkan lignin dan hemiselulosa, menurunkan tingkat kekristalan selulosa sehingga meningkatkan fraksi amorph selulosa, dan meningkatkan porositas material (Sánchez dan Cardona, 2007; Zhu dkk., 2008; Hsu dkk., 2010).



Gambar 1.7. Proses pretreatment bambu ukuran 100 mesh

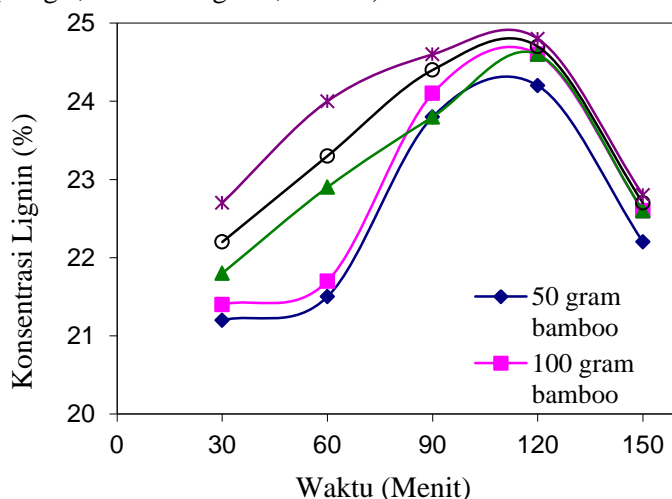
1.10. Proses Delignifikasi

Delignifikasi bambu masih jarang diteliti sehingga belum dapat disimpulkan delignifikator mana yang akan menghasilkan kadar lignin paling minimum. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang delignifikasi bambu untuk mendapatkan hasil berupa lignin maksimum, sehingga dapat mengoptimalkan proses fermentasi selanjutnya pada pembuatan bioetanol. Delignifikasi umumnya menggunakan NaOH dan H_2SO_4 untuk memaksimalkan kadar lignin di dalam bahan berlignoselulosa. (Sumada, dkk., 2011)



Gambar 1.8. Konsentrasi lignin fungsi suhu pada bambu

Pada suhu 100 °C sampai 125 °C, konsentrasi lignin 24,8 % trend stabil pada berat bambu 50 gram sampai 250 gram. Pada penelitian Nibedita Sarkar, 2012 diperoleh suhu optimum pada 168 °C. Lignin adalah bagian utama dari dinding sel tanaman yang merupakan polimer terbanyak setelah selulosa (Anindyawati, Trisanti. 2010) dan merupakan pelindung selulosa dan hemiselulosa. Lignin dapat mengganggu proses hidrolisa karena akan menghambat aktivitas enzim di dalam ragi dalam pengkonversian gula sederhana menjadi etanol (Wiratmaja, Kusuma, & Winaya, 2011) Kandungan lignin dalam kayu daun jarum lebih tinggi daripada dalam kayu daun lebar. Di samping itu, terdapat beberapa perbedaan struktur lignin dalam kayu daun jarum dan dalam kayu daun lebar (Fengel, D. and Wegener, G.1984).



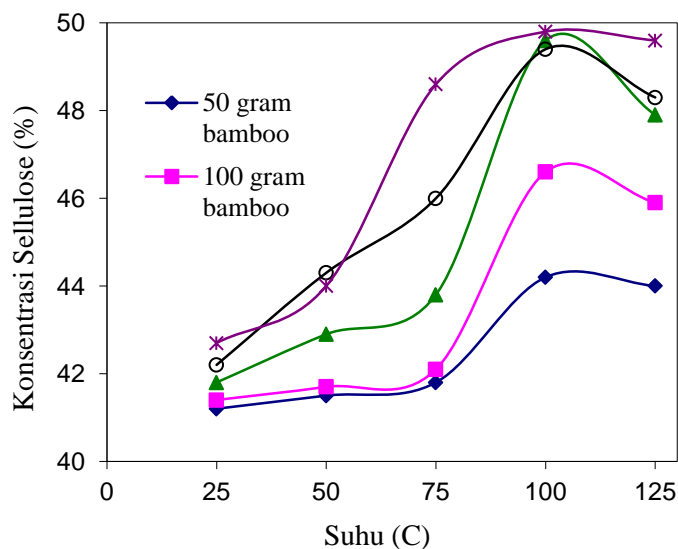
Gambar 1.9. Konsentrasi lignin fungsi waktu pada bambu

Pada waktu 90 menit sampai 120 menit, konsentrasi lignin 24,8 % trend maksimum pada berat bambu 50 gram sampai 250 gram, pada penelitian Nibedita Sarkar, 2012 diperoleh range waktu 30 menit sampai 40 menit. Ada beberapa faktor yang mendorong makin intensifnya dilakukan penelitian pemanfaatan bahan lignoselulosa menjadi sumber energi, dalam hal ini etanol. Pertama, kebutuhan dan konsumsi energi terus meningkat dari tahun ke tahun, sementara sumber daya alam yang dapat menghasilkan energi makin terkuras karena sebagian besar sumber energi

saat ini berasal dari sumber daya alam yang tidak terbarukan, seperti minyak, gas, dan batu bara. Kedua, bioetanol memiliki karakteristik yang lebih baik dibandingkan dengan bensin karena dapat meningkatkan efisiensi pembakaran (Hambali et al.2007)

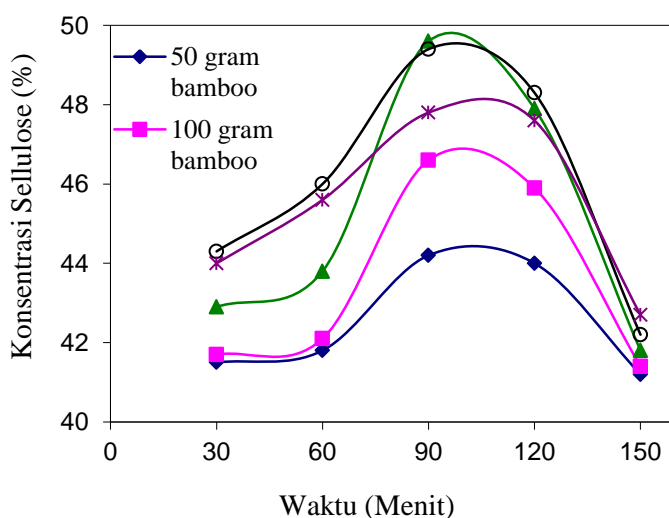
1.11. Proses Hidrolisis

Berbeda dari selulosa yang merupakan homopolisakarida dengan monomer glukosa dan derajat polimerisasi yang tinggi (10.000–14.000 unit), rantai utama hemiselulosa dapat terdiri atas hanya satu jenis monomer (homopolimer), seperti xilan, atau terdiri atas dua jenis atau lebih monomer (heteropolimer), seperti glukomannan. Rantai molekul hemiselulosa pun lebih pendek daripada selulosa. (Fengel dan Wegener 1984; Howard et.al. 2003). Hemiselulosa merupakan suatu kesatuan yang membangun komposisi serat dan mempunyai peranan yang penting karena bersifat hidrofilik sehingga berfungsi sebagai perekat antar selulosa yang menunjang kekuatan fisik serat. Kehilangan hemiselulosa akan menyebabkan terjadinya lubang diantara fibril dan kurangnya ikatan antar serat (Anindyawati, dkk., 2010).



Gambar 1.10. Konsentrasi selulosa fungsi suhu pada bambu

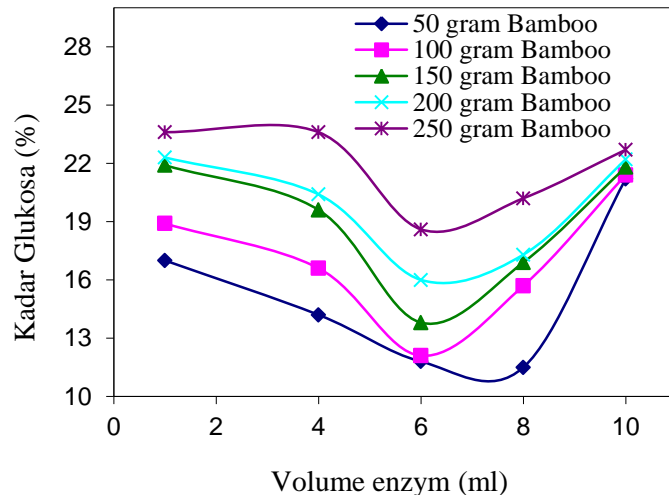
Pada suhu 100 °C, konsentrasi selulosa 48 % trend maksimum pada berat bambu 150 gram. Selulosa dan pati merupakan material yang diperlukan untuk proses pembuatan etanol, selulosa mendekati sama dengan pati, yaitu senyawa polimer dari glukosa, tetapi selulosa dan pati berbeda karena memiliki gugus ikatan C yang berbeda, ikatan polimer selulosa terjadi pada gugus C-beta sedangkan pati memiliki ikatan polimer pada gugus C-alfa. Selulosa berfungsi sebagai bahan struktur dalam jaringan tumbuhan dalam bentuk campuran polimer homolog dan biasanya disertai polisakarida lain dan lignin dalam jumlah yang beragam, molekul selulosa memanjang dan kaku, meskipun dalam larutan (Groggins,1985).



Gambar 1.11. Konsentrasi selulosa fungsi waktu pada bambu

Pada waktu 90 menit, konsentrasi selulose 47,8 % trend maksimum pada berat bambu 150 gram. Pada penelitian Nibedita Sarkar, 2012 diperoleh konsentrasi selulose 47,8 % dari kayu keras dan lunak. Salah satu bahan yang mengandung selulosa yaitu bambu. Persentase selulosa pada bambu yaitu 42,4% – 53,6%. Persentase komponen lain yang terkandung dalam batang bambu adalah lignin (19,8% - 26,6%), pentosan (1,24% - 3,77%), zat ekstraktif (4,5% - 9,9%), air (15% - 20%), abu

(1,24% -3,77%), dan SiO₂ (0,1% - 1,78%). Persentase selulosa yang lumayan besar ini menjadikan bambu sebagai salah satu sumber bioetanol selulosa (Fatriasari, W., & Hermiati, E. 2008)

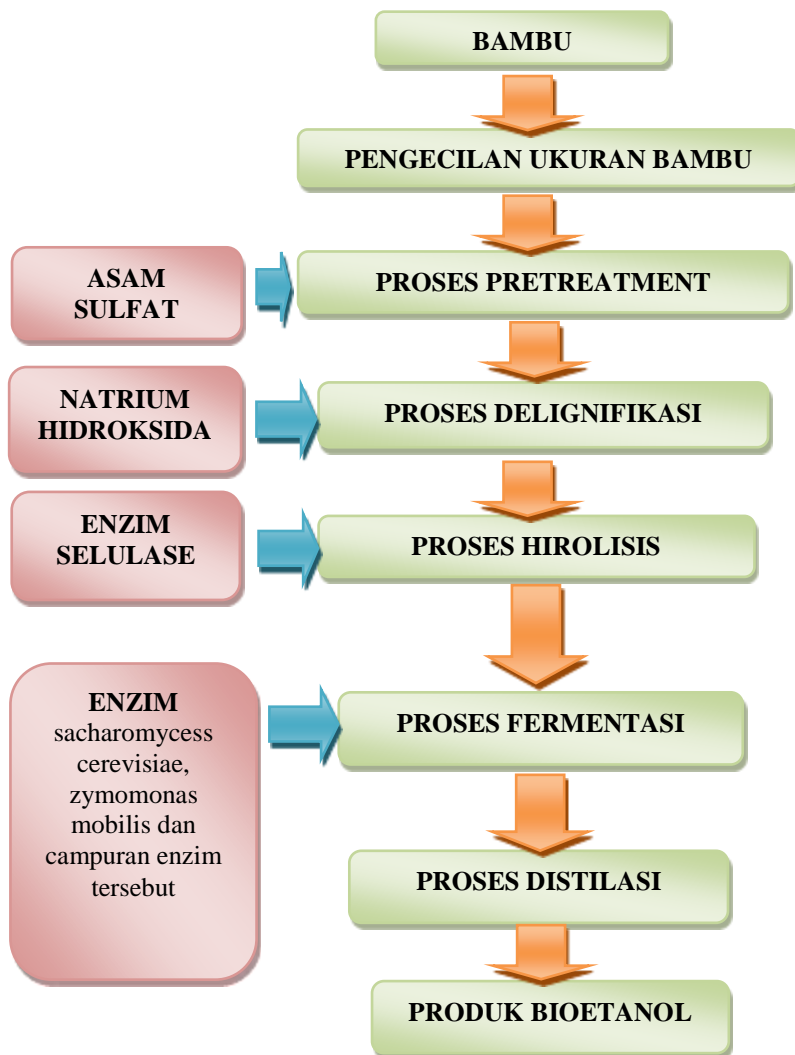


Gambar 1.12. Konsentrasi glukosa fungsi volume enzim pada bambu

Pada volume enzim 4 ml, konsentrasi glukosa maksimum pada 23,6 % trend maksimum pada berat bambu 250 gram, pada penelitian Nibedita Sarkar, 2012 diperoleh kadar maksimum selulosa dari kayu 18,7 %. Dengan hasil yang diperoleh memungkinkan bambu bisa sebagai bahan baku alternatif bioethanol. Ada beberapa faktor yang mendorong makin intensifnya dilakukan penelitian pemanfaatan bahan lignoselulosa menjadi sumber energi, dalam hal ini etanol. Pertama, kebutuhan dan konsumsi energi terus meningkat dari tahun ke tahun, sementara sumber daya alam yang dapat menghasilkan energi makin terkuras karena sebagian besar sumber energi saat ini berasal dari sumber daya alam yang tidak terbarukan, seperti minyak, gas, dan batu bara. Kedua, bioetanol memiliki karakteristik yang lebih baik dibandingkan dengan bensin karena dapat meningkatkan efisiensi pembakaran (Hambali et al.2007)

1.12. Blok Diagram dan Uraian Kegiatan Penelitian

Penelitian produksi bioetanol berbahan baku BAMBU merupakan penelitian laboratorium dalam skala mini plant, metodologi dan sistematika pelaksanaan penelitian seperti ditunjukkan dalam blok diagram berikut ini.



Gambar 1.13. Blok diagram produksi bioetanol berbahan baku bambu

Penelitian Pada Tahun Kedua (II)

Penelitian pada tahun kedua meliputi :

- a. Proses fermentasi dengan enzim *sacharomycess cerevisiae*, *zymomonas mobilis* dan campuran enzim dimaksudkan untuk merubah glukosa menjadi bioetanol. Aspek yang dikaji meliputi :
 - b. Perbandingan berat (volume) setiap enzim yang diaplikasikan terhadap larutan glukosa
Konsentrasi larutan glukosa
- c. Waktu fermentasi
 - a. Hasil yang diperoleh merupakan optimasi proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa dan optimasi proses fermentasi glukosa menjadi bioetanol.
 - b. Proses distilasi produk fermentasi dalam skala mini plant dimaksudkan untuk peningkatan konsentrasi (pemurnian) bioetanol. Aspek yang dikaji meliputi:
- d. Konsentrasi umpan (kadar bioetanol) masuk kolom distilasi
- e. Waktu operasional kolom distilasi
- f. Hasil yang diperoleh merupakan rancangan menara (kolom) distilasi untuk pemurnian bioetanol berbahan baku bambu.

Lokasi penelitian dilakukan di dua tempat yaitu: di laboratorium Riset Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Pembangunan Nasional (UPN) "Veteran" Jawa Timur dan di laboratorium PT. MOLINDO.

1.13. Kesimpulan

Kondisi optimum konsentrasi selulose sebesar 47,8 % pada berat bambu 150 gram, suhu 100 °C, dan waktu 90 menit dengan penurunan konsentrasi lignin 24,8 %. Dengan konsentrasi selulose sebesar 47,8 % diperoleh konsentrasi glukosa maksimum 23,6 %. Bambu bisa mengatasi permasalahan bahan baku yang dibutuhkan oleh industri bioetanol serta meningkatkan daya guna tanaman bambu. Menghasilkan proses dan teknologi produksi bioetanol berbahan baku bambu, serta merekomendasi aplikasi tanaman bambu sebagai salah satu bahan baku bioetanol.

1.14. Saran

1. Dalam mengatasi permasalahan industri bioetanol di Indonesia berkaitan dengan ketersediaan bahan baku disarankan beralih ke bahan baku selulosa yang bisa dibudidayakan.
2. Untuk meningkatkan daya guna tanaman bambu, yang semula dipakai sebagai pagar hidup, serta penggunaan limbah industri kerajinan bambu sebagai bahan baku produk bioethanol, mengandung kadar selulosa yang tinggi, bisa sebagai bahan baku alternatif bioethanol
3. Dalam mengembangkan wawasan keilmuan berkaitan dengan proses produksi bioetanol, menggunakan metode dan proses yang lebih ekonomis.

Bab 2

MIKROBIOLOGI

2.1. PENDAHULUAN

Mikrobiologi berasal dari bahasa Yunani, dari kata “*mikros*” yang berarti kecil, “*bios*” yang berarti hidup dan “*logos*” yang berarti ilmu. Jadi definisi mikrobiologi adalah suatu ilmu yang mempelajari kehidupan makhluk yang bersifat mikroskopik yang disebut “**Mikroorganisme**” atau “**Jasad renik**”.

Mikroorganisme adalah makhluk yang mempunyai ukuran sel yang sangat kecil dimana setiap selnya hanya dapat dilihat dengan pertolongan mikroskop.

Apakah yang termasuk mikroorganisme itu ?

Pada umumnya kita mengambil ketentuan, bahwa semua makhluk yang berukuran beberapa mikron atau lebih kecil lagi itu kita sebut mikroorganisme. Satu mikron disingkat menjadi $1 \mu = 0,01 \text{ mm}$. Jadi yang termasuk mikroorganisme antara lain :

1. Bakteri
2. Cendawan atau jamur tingkat rendah
3. Ragi, yang menurut sistematik masuk bangsa jamur juga.
4. Ganggang/algae
5. Protozoa atau hewan bersel satu
6. Virus (**Makhluk Ultra Mikroskop**)

Bakteri, cendawan, ragi, ganggang/alga, protozoa mempunyai ukuran dalam satuan mikron (μ) dan bisa diamati dengan menggunakan mikroskop biasa ; sedangkan Virus mempunyai ukuran yang sangat kecil, yaitu dalam satuan $m\mu$ ($1 m\mu = 0,01 \mu$) sehingga virus ini dinamakan “**Makhluk Ultra Mikroskop**” dan untuk mengamatnya hanya bisa digunakan mikroskop elektron.

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

Mikrobiologi mencakup pengetahuan tentang virus (Virologi), pengetahuan tentang bakteri (Bakteriologi), pengetahuan tentang hewan bersel satu (Protozoologi), pengetahuan tentang jamur (Mikologi), terutama yang meliputi jamur-jamur rendah seperti **Phycomycetes**, dan juga **Ascomycetes** serta **Deuteromycetes**.

Bagaimana membedakan barang mati dengan mikroorganisme ?

Tidaklah mudah bagi seseorang untuk mengatakan dengan tegas apakah sesuatu yang sangat halus itu termasuk makhluk hidup ataukah barang mati. Kedudukan virus dalam hal ini sulit untuk dijelaskan, tetapi umumnya orang condong untuk mengatakan virus itu mikroorganisme juga.

Pada umumnya dapatlah kita berikan kriteria hidup itu sebagai berikut:

- a. Makhluk hidup mengadakan pertukaran zat atau metabolisme, yaitu mengambil zat makanan dan membuang sisa makanan.
- b. Makhluk hidup mengalami pertumbuhan, semula kecil kemudian bertambah besar.
- c. Makhluk hidup mengadakan pembiakan atau reproduksi, semula jumlahnya sedikit, kemudian jumlah itu menjadi besar.
- d. Makhluk hidup mempunyai tanggapan terhadap pengaruh dari luar, tanggapan mana berguna bagi keseluruhan hidupnya.
- e. Makhluk hidup mengadakan gerak, meskipun kadang-kadang sukar untuk diamati. Banyak mikroorganisme yang sama sekali tidak mempunyai gerak, namun mereka tetap termasuk makhluk hidup, karena memenuhi keempat kriteria lainnya.

2.2. PERANAN MIKROBIOLOGI DALAM BIDANG TEKNOLOGI INDUSTRI

Makanan merupakan kebutuhan pokok bagi setiap manusia, karena di dalamnya terkandung senyawa-senyawa yang sangat diperlukan untuk memulihkan dan memperbaiki jaringan tubuh yang rusak, mengatur proses di dalam tubuh, perkembangbiakan dan menghasilkan energi untuk kepentingan berbagai kegiatan dalam kehidupannya.

Bahan makanan dengan komposisi demikian merupakan medium pertumbuhan mikroba. Dalam pertumbuhannya, jasad renik ini bergantung

pada jenisnya, dapat membusukkan protein, memfermentasikan-dan menjadikan lemak dan minyak berbau tengik.

Dalam bidang Teknologi Pangan, Mikrobiologi Pangan merupakan ilmu yang sangat penting, misalnya :

1. Dalam hubungan dengan **kerusakan atau kebusukan makanan** sehingga dapat diketahui tindakan pencegahan atau pengawetan yang paling tepat untuk menghindari terjadinya kerusakan tersebut.
2. Dalam fermentasi makanan, sanitasi, pengawasan mutu pangan dan sebagainya.

Populasi mikroorganisme dalam setiap makanan dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti tersedianya nutrien, air, suhu, pH, oksigen, potensial oksidasi reduksi dan adanya zat penghambat. Bila jasad renik populasinya meningkat, dapat menimbulkan berbagai masalah antara lain:

1. Dapat menentukan taraf mutu makanan.
2. Mengakibatkan kerusakan pangan.
3. Beberapa diantaranya dapat digunakan untuk membuat produk-produk pangan khusus.
4. Merupakan sarana penularan beberapa penyakit perut menular.
5. Keracunan makanan, yang tidak jarang menimbulkan kematian.

Dengan demikian keberadaan mikroorganisme yang ada pada umumnya mikroorganisme pencemar, dapat menimbulkan kerugian tapi dapat pula menguntungkan.

Dalam bidang Teknologi Pangan, mikroorganisme dapat bersifat :

1. Mendatangkan keuntungan

a. Berperan di dalam proses pembuatan pangan khusus.

Berbagai jenis makanan dan minuman hasil fermentasi, seperti tempe, kecap, taoco, bekacem, sosis, keju, bier, brem, tuak, anggur dan sebagainya telah sejak lama dikenal melengkapi menu makanan dan minuman sehari-hari. Makanan dan minuman tersebut diolah secara fermentasi dengan menggunakan kemampuan mikroba.

Dalam fermentasi makanan dan minuman, pertumbuhan mikroorganisme justru dirangsang untuk mengubah komponen-kom-

ponen di dalam bahan pangan menjadi produk-produk yang diinginkan.

b. Berperan di dalam peningkatan nilai gizi/nutrisi makanan

Ini terjadi seperti di dalam pembuatan tempe dari kedelai ataupun pembuatan bahan makanan lain seperti oncom, tauco, terasi, bekacem dan sebagainya, yang disamping akan menghasilkan nilai gizi/nutrisi yang jauh lebih baik dan lengkap, juga nilai organoleptik makanan hasilnya akan lebih baik dan meningkat.

c. Berperan di dalam "pengadaan" bau dan rasa

Bau dan rasa kacang kedelai yang langsung direbus, rata-rata kurang menarik kalau dibandingkan dengan kacang kedelai yang telah diproses melalui proses fermentasi. Juga bau dan rasa susu segar, misalnya banyak yang tidak menyukai kalau dibandingkan dengan susu tersebut telah diproses secara fermentasi menjadi yoghurt misalnya.

d. Berperan di dalam "perubahan" warna

Warna, seperti juga bau dan rasa, mempunyai arti yang sangat penting untuk bahan makanan. Warna makanan yang menarik, akan lebih banyak mendatangkan peminat kalau dibandingkan makanan tersebut tidak mempunyai warna tertentu.

Penggunaan warna pada bahan makanan yang akhir-akhir ini banyak ditentang karena berbentuk warna buatan secara kimia (bahkan ada pula yang menggunakan warna untuk bahan celup tekstil), yang dari beberapa hasil penelitian ada batas tertentu dapat bersifat karsinogenik (menyebabkan terjadinya kanker, terutama pada hati), mulai beralih pada warna yang dihasilkan mikroba. Warna hasil proses mikroba disamping sesuai untuk tubuh, stabil juga aman (tidak ada kecenderungan bersifat karsinogenik)

2. Mendatangkan Kerugian

Dimaksud dengan mendatangkan kerugian, kalau kehadiran mikroba tersebut di dalam bahan makanan, justru akan :

- a. Mengubah bau, rasa dan warna yang tidak dikehendaki
- b. Menurunkan berat atau volume
- c. Menurunkan nilai gizi/nutrisi

- d. Mengubah bentuk dan susunan senyawa.
- e. Menghasilkan toksin (senyawa racun) yang membahayakan.
- f. Menyebabkan penyakit.

Kelompok mikroba seperti bakteri, jamur dan ragi (yang masih termasuk jamur) merupakan penyebab terjadinya kerugian pada bahan makanan seperti diatas. Karenanya terhadap bahan makanan, sejak bahan baku, selama proses, selama pengolahan dan penyimpanan selalu diusahakan untuk tidak dikenai dan ditumbuhi mikroba tersebut. Keberadaan mikroorganisme ini di dalam makanan tidak diinginkan.

Bakteri patogen dapat memproduksi racun atau toksin yang menyebabkan suatu penyakit pada manusia. Berdasarkan toksin yang dihasilkan bakteri, sesuai dengan sifat kimianya dapat dibagi dua golongan yaitu endotoksin dan eksotoksin.

Kerusakan yang paling umum terjadi pada bahan makanan adalah pembusukan, dan ini dapat disebabkan oleh bakteri ataupun jamur. Pada umumnya bahan makanan seperti telur, daging, sayuran dan buah-buahan akan sangat cepat membusuk kalau dibiarkan/disimpan tanpa aturan sehingga tidak mungkin dikonsumsi. Di lain pihak seringkali makanan yang mengandung enterotoksin dalam jumlah cukup banyak untuk dapat menimbulkan penyakit, biasanya mempunyai penampilan, bau dan rasa yang normal, sehingga masih dikonsumsi dan menimbulkan keracunan bagi konsumen. Cara pencegahan yang terbaik ialah menyimpan semua bahan makanan yang mudah busuk dalam lemari es (suhu 6 sampai 7 C), dimana enterotoksin tidak terbentuk jika makanan disimpan pada temperatur tersebut. Makanan yang sudah dipanasi kembali tidak boleh dibiarkan berjam-jam pada suhu kamar sebelum disajikan.

2.3. SEJARAH MIKROBIOLOGI

1. Antonie Van Leeuwenhoek (1632 – 1723)

Sejarah mikrobiologi dimulai tahun 1674 ketika **Antonie Van Leeuwenhoek** menemukan adanya kehidupan di dalam setetes air danau yang diamati menggunakan lensa gelas. Benda-benda yang disebut “Animalcules” tersebut terlihat dalam berbagai bentuk, ukuran dan warna. Sebelum penemuan tersebut, berlaku teori “Generatio

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

Spontanea” (makhluk hidup dapat terbentuk secara spontan dari benda-benda mati/bahan organik yang telah mengalami pembusukan. **Antonie Van Leeuwenhoek** kemudian mengamati adanya makhluk hidup pada berbagai bahan lainnya menggunakan mikroskop sederhana hasil ciptaannya. Dia menyimpulkan bahwa sel-sel hidup selalu berasal dari benih (*germ*).

2. Francesco Redi (1626 – 1697)

Francesco Redi menentang teori ”Generatio Spontanea” dan melakukan percobaan dengan menutup sepotong daging dengan kasa halus untuk mencegah hinggapnya lalat yang dapat bertelur diatasnya. Setelah didiamkan dalam waktu tertentu, ternyata pada daging yang tidak ditutupi banyak ditumbuhi ulat yang berasal dari telur lalat, sedangkan pada daging yang ditutupi tidak terlihat adanya ulat.

3. Lazzaro Spallanzani (1729 – 1799)

Lazzaro Spallanzani menentang teori ”Generatio Spontanea” dan melakukan percobaan dengan membuat suatu suspensi bahan organik di dalam tabung gelas, kemudian mendidihkannya. Ternyata cairan tersebut tidak rusak atau busuk dan tidak mengandung sel-sel hidup. Sel-sel hanya tumbuh jika tabung dibuka sehingga cairan mengalami kontak dengan udara luar yang merupakan sumber kontaminasi jasad renik.

4. Nicholas Appert (1810)

Nicholas Appert pada tahun 1810 memenangkan hadiah 12.000 franc karena untuk pertama kalinya berhasil mengawetkan berbagai bahan pangan yang mudah rusak menggunakan proses pemanasan di dalam tabung gelas atau botol. Sejak saat itu proses pemanasan dilakukan sebagai salah satu cara untuk mengawetkan makanan.

5. Louis Pasteur (1822 – 1895)

Louis Pasteur sangat menentang teori ”Generatio Spontanea”.dan mengemukakan teorinya “**Omne vivum ex ovo, omne ovum ex vivo**” , yang artinya kehidupan hanya dapat terjadi karena ada kehidupan sebelumnya. Dalam tahun 1860, Pasteur melakukan percobaan menggunakan labu gelas berbentuk bulat yang diisi ekstrak bahan organik atau

larutan gula, dimana pada ujung lehernya kemudian dipanaskan dan ditiup sehingga membentuk pipa agak panjang berbentuk huruf U. Setelah labu dipanaskan, ternyata di dalam labu Pasteur tersebut setelah beberapa waktu tidak pernah terlihat adanya pertumbuhan jasad renik. Tetapi jika leher labu dipatahkan dan dibiarkan terbuka dan terkontaminasi oleh udara, dalam satu hari atau lebih akan terlihat adanya pertumbuhan di dalam tabung tersebut sehingga cairan didalamnya menjadi busuk. Ternyata bentuk U dari pipa pada leher labu dapat menahan masuknya jasad renik dari udara ke dalam labu.

Louis Pasteur juga dikenal karena teori yang dikemukakannya dalam fermentasi. Pada tahun 1857 dan 1862, ia menemukan bahwa sel khamir dapat menyebabkan terjadinya fermentasi pada anggur dan bir dan menemukan bahwa proses pemanasan dapat membunuh khamir yang dapat menyebabkan kerusakan pada minuman tersebut. Dari penemuan ini, kemudian dikenal **proses pasteurisasi** yang diterapkan pada anggur, bir dan produk-produk susu. Pada tahun 1879 – 1880, Pasteur membuktikan bahwa hewan (dalam percobaannya digunakan kambing) dapat diimunisasi terhadap penyakit Anthrax dan pada tahun 1885 memperkenalkan cara pencegahan penyakit *Rabies*.

6. John Tyndall

John Tyndall seorang Inggris, pada tahun 1876, menemukan bahwa pemanasan yang dilakukan oleh **Louis Pasteur** tidak cukup untuk membunuh semua jasad renik di dalam suatu bahan karena beberapa jasad renik diantaranya bersifat sangat tahan panas. Ia menyimpulkan bahwa beberapa bakteri mungkin terdapat dalam salah satu dari dua bentuk yaitu :

1. Bentuk Vegetatif yang tidak tahan panas dan mudah dibunuh dengan mendidihkan
2. Bentuk Endospora yang tahan panas dan tidak mati dengan perebusan.

John Tyndall kemudian mengembangkan suatu cara untuk membunuh endospora yang sangat tahan panas. Caranya adalah dengan pemanasan bahan yang mengandung endospora secara tidak sinambung. Dengan cara ini, setelah pemanasan bahan didiamkan sehingga spora

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

bergeminesi menjadi sel vegetatif, kemudian dipanaskan lagi untuk membunuh sel vegetatif yang tidak tahan panas tersebut. Didiamkan lagi, dipanaskan lagi dan seterusnya sehingga semua endospora terbunuh. Cara ini kemudian disebut proses **Tindalisasi**.

7. Ferdinand Cohn

Ferdinand Cohn seorang Jerman, pada tahun 1876 menemukan adanya endospora dan membuktikan sifat ketahanan panasnya.

8. Robert Koch (1843 - 1910)

Robert Koch menemukan pemakaian medium padat menggunakan bahan pematat gelatin untuk mengisolasi suatu jenis jasad renik dari suatu campuran jasad renik. Dalam perkembangannya, untuk memadatkan media pertumbuhan jasad renik kemudian digunakan bahan yang lebih baik yaitu agar-agar yang berasal dari gulma laut yang mempunyai sifat pematat lebih baik daripada gelatin. Dari hasil penelitian Koch, dikemukakan prinsip-prinsip teori yang dikenal sebagai "**Postulat Koch**", yaitu :

- a. Jasad renik dapat ditemukan sebagai penyebab suatu. gejala penyakit tertentu.
- b. Jasad renik dapat diisolasi di laboratorium sebagai kultur murni.
- c. Kultur murni tersebut dapat menimbulkan penyakit dengan gejala spesifik bila diinokulasikan pada hewan sehat yang sensitif.
- d. Dari hewan yang dibuat sakit tersebut jasad renik tersebut. dapat diisolasi kembali .
- e. dengan sifat-sifat seperti jasad renik semula.

Seperti halnya makhluk hidup lainnya, jasad renik memerlukan

energi untuk kelangsungan hidupnya. Energi diperlukan oleh jasad renik untuk berbagai kegiatan, yaitu : (1) mempertahankan kehidupan sel, (2) pertumbuhan dan perkembangan biakan sel, dan (3) untuk pergerakan pada jasad renik yang bersifat motil (dapat bergerak).

2.4. METABOLISME ENERGI SUMBER ENERGI

Berdasarkan sumber energi yang digunakan, jasad renik dapat dibedakan atas dua grup, yaitu:

1. **Organisme fototrof**, yaitu organisme yang menggunakan sinar matahari untuk menghasilkan enersi. Berdasarkan sumber karbon yang digunakan, organisme fototrof dibedakan lagi sebagai berikut:

Organisme	Sumber	Sumber	Contoh
a. Fotoototrof	Matahari	CO ₂	Tanaman,
b. Fotoheterotrof	Matahari	Senyawa organik	ganggang Ganggang biru-hijau

2. **Organisme kimotrof**, yaitu organisme yang menggunakan senyawa kimia untuk menghasilkan enersi. Berdasarkan sumber karbon yang digunakan, organisme kimotrof dapat dibedakan lagi sebagai berikut:

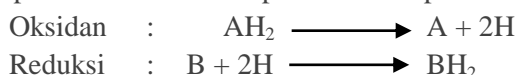
Organisme	Sumber enersi	Sumber karbon	Contoh
a. Kimoototrof	Senyawa kimia	CO ₂	Bakteri litotrof
b. Kimoheterotrof	Senyawa kimia	Senyawa organik	Hewan, protozoa, fungi, bakteri

Organisme fotoheterotrof mungkin bersifat obligat atau fakultatif, tergantung pada persediaan sumber enersi. Organisme fotoheterotrof obligat hidupnya sangat tergantung pada sumber enersi dari sinar matahari, sedangkan yang bersifat fakultatif, jika sumber enersi dari matahari sangat berkurang, misalnya dalam keadaan gelap, organisme tersebut dapat berubah sifatnya menjadi kimoheterotrof. Demikian pula organisme kimoototrof, ada yang bersifat obligat atau fakultatif. Organisme kimoototrof obligat hidupnya sangat tergantung pada adanya sumber CO₂, sedangkan yang bersifat fakultatif jika sumber CO₂ sangat berkurang, organisme tersebut akan berubah sifatnya menjadi kimo-heterotrof.

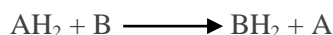
Semua reaksi yang menghasilkan enersi pada bakteri yang bersifat

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

kimotrofik merupakan reaksi oksidasi-reduksi, yaitu pemindahan atom hidrogen atau elektron dari satu senyawa ke senyawa lainnya. Untuk dapat digunakan sebagai sumber enersi, harus terjadi reaksi oksidasi reduksi dimana diperlukan persediaan suatu oksigen dan reduktan dalam jumlah berlebih. Oksidasi adalah pelepasan elektron dari suatu atom atau molekul yang bertindak sebagai donor hidrogen (reduktan), sedangkan reduksi adalah penambahan elektron pada suatu aseptor hidrogen (oksidan).



Hasil kedua reaksi tersebut menunjukkan oksidasi senyawa AH_2 oleh senyawa B sebagai berikut :



Dalam hal ini AH_2 adalah suatu reduktan, sedangkan senyawa B adalah oksidan. Senyawa yang dapat berfungsi sebagai oksidan atau reduktan mungkin berupa senyawa organik atau anorganik. Berdasarkan jenis senyawa yang digunakan sebagai oksidan atau reduktan, maka reaksi oksidasi yang menghasilkan enersi pada jasad renik dapat dibedakan sebagai berikut :

Donor electron	Aseptor electron	
	Anorganik	Organik
Anorganik (litotrof)	Respirasi	Tidak terjadi
Organik (organotrofik)	Respirasi	Fermentasi

Organisme **litotrof** atau **kimolitotrof**, termasuk diantaranya beberapa jenis bakteri, adalah organisme yang memperoleh enersi melalui oksidasi suatu reduktan anorganik, misalnya sulfur atau amonia. Organisme litotrof pada umumnya bersifat ototrof, yaitu mendapatkan sumber karbon dari CO_2 . Organisme yang tergolong **organotrof** mengoksidasi donor hydrogen yang berupa senyawa organik, contohnya pada hewan, fungi dan kebanyakan bakteri. Jadi istilah litotrofik dan organotrofik menunjukkan perbedaan dalam donor elektronnya.

Reaksi respirasi dan fermentasi adalah reaksi yang menunjukkan perbedaan dalam aseptor hidrogen (penerima elektron). **Respirasi** adalah

reaksi oksidasi yang menggunakan senyawa anorganik sebagai oksidan (penerima elektron) sedangkan fermentasi adalah reaksi oksidasi yang menggunakan senyawa organik baik sebagai oksidan maupun sebagai reduktan (donor elektron).

Jasad renik yang sering tumbuh pada bahan pangan pada umumnya bersifat kimoorganotrof, dimana sebagai sumber enersi dan sumber karbon digunakan senyawa organik.

RESPIRASI

Berbagai organisme melakukan respirasi menggunakan senyawa anorganik sebagai oksidan, sedangkan sebagai reduktan dapat berupa senyawa organik maupun anorganik (Tabel 1.1). Respirasi yang menggunakan oksigen sebagai penerima elektron disebut respirasi aerobik, sedangkan yang menggunakan senyawa anorganik sebagai penerima elektron disebut respirasi anaerobik.

Respirasi terhadap bahan organik terjadi dalam dua tahap yaitu:

1. Oksidasi substrat menjadi CO_2 dengan cara melepaskan atom hydrogen secara bertahap. Reaksi terse but misalnya yang terjadi dalam siklus Krebs.
2. Oksidasi atom hydrogen yang dilepaskan dalam reaksi tahap pertama oleh oksigen atau senyawa anorganik, membentuk ATP.

Skema proses respirasi terhadap bahan organik, yaitu yang dilakukan oleh organisme yang tergolong organotrof dapat dilihat pada Gambar 2.1.

Tabel 2.1. Reduktan dan oksidan yang digunakan dalam respirasi oleh berbagai organisme

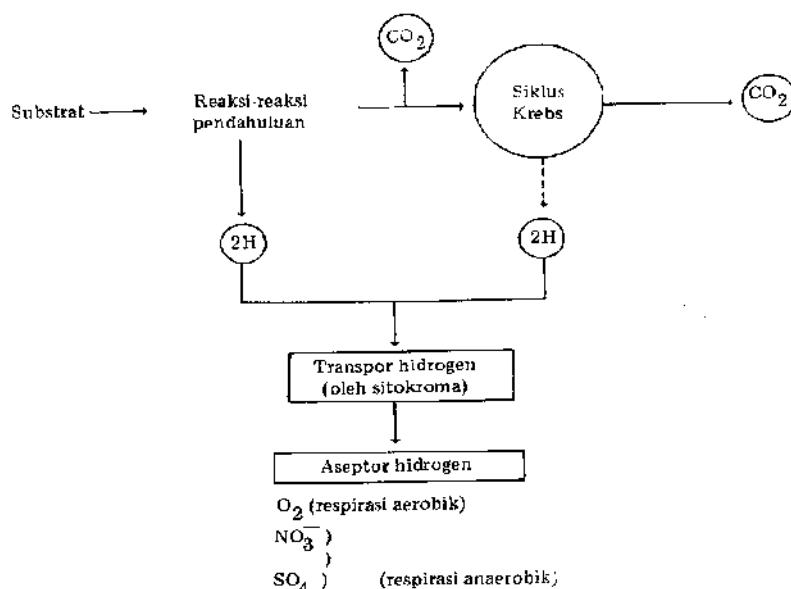
Reduktan	Oksidan	Produk (+ enersi)	Organisme
Organotrof: Senyawa organik	O_2	$CO_2 + H_2O$	Kebanyakan bakteri, semua hewan dan tanaman
	NO_3^-	$N_2 + CO_2$	Bakteri denitrifikasi
Senyawa organik	O_2	$NO_3^- + H_2O$	Bakteri nitrifikasi (<i>Nitrobacter</i>)
Litotrof NO_2^-	O_2	$NO_2^- + H_2O$	Bakteri nitrifikasi (<i>Nitrosomonas</i>)
NH_3	O_2	Fe^{3+}	
Fe^{2+}	O_2	$SO_4^{2-} + H_2O$	Bakteri besi (<i>Ferrobacillus</i>)
S^{2-}	O_2	H_2O	Bakteri sulfur (<i>Thiobacillus</i>)
H_2	SO_4^{2-}	$H_2O + S^{2-}$	Bakteri hydrogen <i>Desulfovibrio</i>

Sistrom (1960)

Respirasi Aerobik

Pada respirasi aerobik, oksigen bertindak sebagai aseptor hidrogen, dan reaksi oksigen dengan hidrogen akan membentuk air. Dengan kata lain, respirasi aerobik adalah reaksi oksidasi substrat menjadi CO_2 dan air, membentuk enersi dalam bentuk ATP. Transpor atom hidrogen dari substrat ke oksigen berlangsung melalui sitokroma. Pigmen-pigmen tersebut melakukan reaksi oksidasi-oksidasi, dimana sitokroma yang terakhir akan dioksidasi oleh oksigen membentuk air. Enersi yang dikeluarkan dari reaksi hidrogen dan oksigen digunakan untuk membentuk ATP. Untuk setiap pasang atom hidrogen yang

teroksidasi akan terbentuk tiga molekul ATP.



Gambar 2.1. Skema proses respiurasi pada organisme organotrof

Respirasi Anaerobik

Beberapa bakteri tidak menggunakan oksigen sebagai oksidan, tetapi menggunakan senyawa anorganik seperti sulfat dan nitrat. Proses demikian disebut **respirasi anaerobic**. Sebagai contoh, bakteri dari jenis **Desulfovibrio** melakukan oksidasi senyawa organik menggunakan sulfat (SO_4^{2-}) sebagai oksidan, dimana sulfat akan mengalami reduksi menjadi sulfide (S_2). Bakteri dari jenis tersebut tidak dapat menggunakan oksigen sebagai aseptor electron.

Bakteri denitrifikasi dapat menggunakan nitrat maupun oksigen dalam respirasi. Bakteri tersebut akan mereduksi nitrat (NO_3^-) hanya jika tidak terdapat oksigen, dimana nitrat akan direduksi menjadi gas nitrogen (N_2), ammonia (NH_3) atau nitrogen oksida (N_2O), tergantung dari jenis bakterinya.

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

Bab 3

SIFAT DAN KLASIFIKASI MIKROBA

3.1. PENDAHULUAN

Mikrobia pangan dapat dibedakan atas **mikrobia yang bersifat menguntungkan**, dimana dapat membantu proses pengolahan (misalnya : yang dipergunakan untuk proses fermentasi pangan) dan **mikrobia yang bersifat merugikan**, yaitu yang dapat merusak bahan pangan atau yang dapat menimbulkan penyakit (bersifat patogen). Mikrobia yang bersifat menguntungkan perlu diketahui sifat-sifat spesifiknya sehingga dapat dikembangkan menjadi mikrobia yang bersifat lebih potensial untuk produksi pangan. Demikian juga untuk jenis mikrobia yang bersifat perusak atau patogen, perlu diketahui sifat-sifatnya sehingga dapat dicegah atau dihambat pertumbuhannya atau dapat dibunuh sel dan sporanya.

Secara umum mikrobia pangan juga dapat dibedakan berdasarkan jenisnya yaitu tergolong dalam **Eukariotik** termasuk jamur dan khamir, dan yang tergolong dalam **Prokariotik**, yaitu bakteri. Selain penggolongan umum berdasarkan jenisnya, juga dapat digolongkan berdasarkan sifat dan kondisi pertumbuhannya meliputi suhu, pH, kandungan air bahan (a_w), oksigen, kadar gula, kadar garam dan kandungan nutrien bahan

3.2. JAMUR (KAPANG)

Jamur yang tumbuh pada bahan pangan secara visual dapat terlihat seperti kapas atau benang berwarna ataupun tidak berwarna yang disebabkan oleh terbentuknya miselia dan spora jamur. Klasifikasi jamur berdasarkan atas sifat-sifat morfologis, kultural dan fisiologis.

Sifat-sifat morfologis ditentukan oleh bentuk dan struktur, berdasarkan kenampakan secara makroskopis dan mikroskopis. Sifat-

sifat tersebut dapat dipergunakan untuk identifikasi dan klasifikasi jamur.

Sifat-sifat morfologis jamur meliputi :

1. Pembentukan hifa dan miselia

Hifa adalah benang-benang yang dibentuk oleh jamur, sedang yang dibentuk hifa adalah miselia. Secara mikroskopis hifa jamur dapat dibedakan atas dua golongan yaitu yang bersepta dan yang tidak bersepta.

2. Struktur dan bagian yang memproduksi

Jamur dapat tumbuh dari sebuah miselia, tetapi reproduksinya terutama oleh adanya spora yang bersifat aseksual, tetapi juga ada yang bersifat seksual. Spora yang bersifat aseksual dihasilkan jamur dalam jumlah banyak, kecil-kecil dan tahan terhadap suasana kering. Spora aseksual dapat dibedakan atas empat jenis yaitu **konidia**, **arthrospora** atau **oidia**, **sporangiospora** dan **khlamidospora**. Sifat-sifat spora aseksual dapat dipergunakan untuk membantu identifikasi jamur. Spora aseksual dapat dibedakan berdasarkan atas tempat pembentukan dan jenis produksinya.

Jamur yang mempunyai hifa tak bersepta (Phycomycetes) dapat menghasilkan oospora yang dibentuk oleh bersatunya gamet jantan dan betina. Pada Zygomycetes, pembentukan zigospora oleh pertemuan ujung-ujung hifa dari miselia yang sama atau dapat juga berbeda. Sedang pada Ascomycetes (bersepta) spora seksual disebut ascospora dibentuk oleh miselia yang sama atau dari dua miselia yang terpisah. Pada Basidiomycetes spora seksualnya disebut basidiospora.

Sifat kultural jamur ditentukan oleh kenampakan pertumbuhan jamur pada makanan. beberapa jamur tumbuh terpisah-pisah dan ada yang kompak, pada permukaan bahan kelihatan kering atau membentuk masa seperti serbuk (powder), kadang-kadang halus dan lunak atau kelihatan basah dan berair. Warna miselia jamur dapat merah, kuning, coklat, abu-abu, hitam, sedang warna sporanya adalah hijau, biru, biru kehijauan, kuning, oranye, merah muda, coklat, abu-abu atau hitam.

Sifat-sifat fisiologis jamur ditentukan oleh :

1. Kebutuhan sel akan air

Secara umum, jamur membutuhkan air lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri. Kebutuhan sel terhadap air ditentukan oleh nilai aktivitas air (a_w) bahan, yaitu merupakan perbandingan antara tekanan uap air dalam larutan dengan tekanan uap air murni. Nilai a_w yang diperlukan oleh mikrobia untuk pertumbuhan ditentukan oleh macam zat pelarut terutama kemampuannya untuk mengurangi a_w , nilai gizi media pertumbuhan, suhu, kebutuhan oksigen, pH dan ada tidaknya zat penghambat.

2. Suhu yang diperlukan untuk pertumbuhan

Suhu optimum pertumbuhan jamur dapat dibedakan atas tiga golongan yaitu yang mempunyai suhu optimal rendah (psikrofil), suhu sedang (mesofil) dan suhu tinggi (termofil).

3. Kebutuhan terhadap oksigen dan pH

Jamur bersifat aerobik yaitu selalu membutuhkan oksigen untuk pertumbuhan, dan mempunyai interval pH sekitar 2,0 – 8,5.

4. Kebutuhan terhadap nutrisi

Secara umum jamur dapat mempergunakan jenis makanan mulai yang sederhana sampai dalam bentuk kompleks. Sebagian besar jamur bersifat hidrofilik, dapat menghasilkan enzim emilase, pektinase, proteinase dan lipase.

5. Zat penghambat

Zat penghambat terhadap pertumbuhan jamur yang terdapat dalam bahan pangan maupun yang dikeluarkan oleh jenis jamur tertentu, misalnya *Penicillium chrysogenum* menghasilkan penisilin, *Aspergillus lavatus* menghasilkan clavasin. Zat penghambat untuk jamur misalnya asam sorbat, asam propionat, asam asetat atau zat yang bersifat fungisida.

Klasifikasi dan Identifikasi Jamur

Jamur tergolong dalam Eumycetes atau fungi sejati terdiri atas empat kelas yaitu Phycmycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes dan Deuteromycetes (Fungi imperfecti). Identifikasi jamur dapat dilakukan

Teori Dan Aplikasi ...

berdasarkan sifat-sifat morfologisnya. Berdasarkan pengamatan secara mikroskopis, jamur dapat ditentukan sampai spesiesnya.

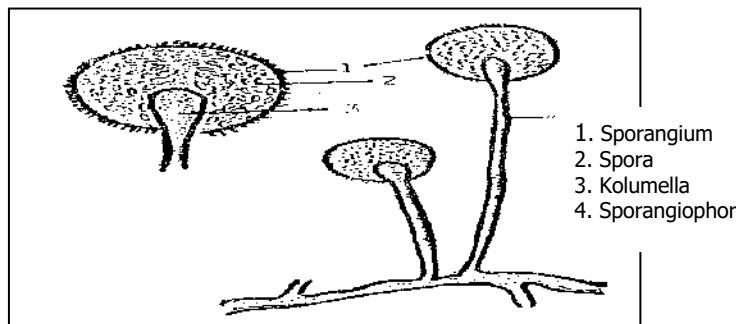
Untuk pengamatan jenis jamur perlu diperhatikan sifat-sifat sebagai berikut :

1. Hifa bersepta atau tidak
2. Miselia jernih atau gelap / keruh
3. Miselia berwarna atau tidak
4. Bila terdapat spora seksual berbentuk oospora, zygospora atau ascospora

Jenis jamur yang terdapat pada bahan pangan :

1. Jamur yang terdapat dalam bahan pangan dan tergolong dalam **klas Phycomycetes bersifat tidak bersepta**.
 - a. **Subklasis Oomycetes**, mempunyai spora seksual : oospora.
Termasuk ordo : saprolognialis yang terkenal adalah *Saprolegnia paracitica* tumbuh pada ikan, disebut juga sebagai jamur air berkembang biak dengan sporangia dan zoospora yang bersifat motil. Ordo peronosporalis yang terkenal adalah genus *Phytophthora* penyebab kerusakan pada beberapa jenis sayuran dan bersifat patogen pada akar tanaman.
 - b. **Suklasis Zygomycetes**, spora seksualnya : zygospora
Ordo : Mucorales, yang terkenal adalah genus *Mucor*.
M. racemosus bersifat perusak pada beberapa jenis makanan. *M. rouxii* dipergunakan sebagai “amylo” proses untuk sakarifikasi pati pada fermentasi makanan.

Sifat-sifat morfologi *Mucor* : hifa tidak bersepta, sporangiospor dibentuk pada semua bagian, kolumela berbentuk bulat, silindris atau oval, spora halus, zygospora dan suspensor hampir sama, tidak mempunyai stolon, rhizoid, atau sporangiola (sporangia kecil) (Gambar 3.1)



Gambar 3.1. Mucor sp

Genus Zygorrhynchus : serupa dengan Mucor tetapi mempunyai zygospora yang tidak samadengan suspensornya dan dibentuk oleh cabang hifa yang sama.

Genus Rhyzopus : yang terkenal sebagai perusak makanan adalah *R. nigricans*, dikenal sebagai “bread mold” terdapat pada roti, jenis sayuran dan buah.

R. oligosporus dikenal sebagai jamur tempe mempunyai sifat yang menguntungkan karena selain bersifat proteolitik dan lipolitik juga mampu menghasilkan zat antibiotik terhadap bakteri-bakteri gram negatif yang bersifat patogen.

R. oryzae bersifat amilolitik juga terdapat pada fermentasi tempe dan kecap.

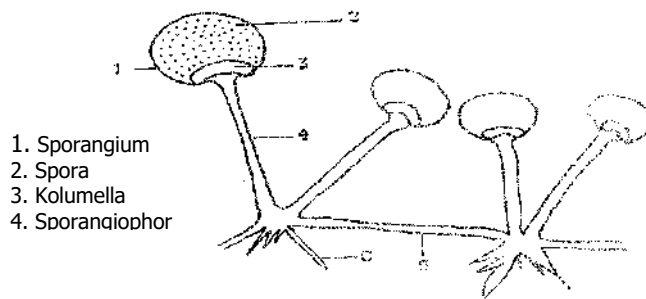
R. arrhizus bersifat pektolitik dan selulolitik, membantu proses fermentasi oncom hitam dan putih kadang-kadang juga terdapat pada tempe.

Sifat-sifat morfologi Rhyzopus : tidak bersepta, mempunyai stolon dan rhyzoid, sporangiospor menonjol pada node tempat rhyzoid terbentuk, sporangia biasanya besar dan berwarna hitam, kolumela hemisperial, apophysis terbentuk cawan, membentuk miselia yang sangat lebat (Gambar 3.2.). Genus Absidia, hampir serupa dengan Rhizopus, tetapi sporangiospor menonjol pada bagian intrernode dan sporangia kecil yang terbentuk agak oval (Gambar 3.3.). Genus Thamnidium, yang terkenal adalah *T. elegans* terdapat pada daging yang disimpan.

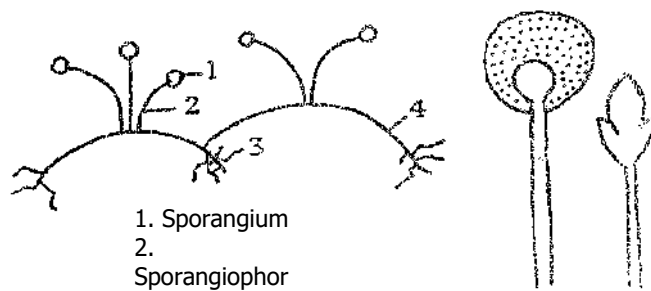
Teori Dan Aplikasi ...

Sifat-sifat morfologi : tidak bersepta, sporangiospor mempunyai sporangia besar pada bagian ujung dan lateral cluster dari sporangola.

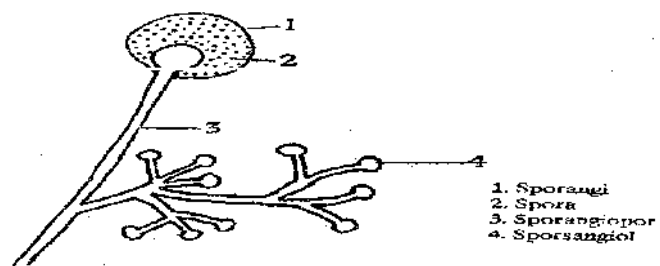
Pada sporangila terdapat dua sampai duabelas atau lebih spora, bercabang-cabang dekat dengan dasar sporangiospor (Gambar 3.4).



Gambar 3.2. : Rhizopus sp



Gambar 3.3 : Absidia sp



Gambar 3.4. : Thamnidium sp

2. Golongan jamur bersepta

Klasis : Fungi imperfecti (Deuteromycetes), tidak mempunyai spora seksual.

Ordo Moniliales : konidiopor bebas keluar dari miselia.

- a. Familia : **Moniliaceae**, mempunyai sifat miselia jernih atau tak berwarna atau berwarna cerah.

Genus *aspergillus*, banyak yang tumbuh pada sereal dan kacang-kacangan selama penyimpanan dan beberapa species dapat menghasilkan zat yang bersifat racun, bersifat kontaminan dan merusak pada beberapa jenis makanan selama penyimpanan, tetapi juga ada species yang dapat dimanfaatkan untuk industri makanan.

Sifat-sifat morfologi aspergillus : bersepta, miselia bercabang biasanya tidak berwarna, konidiophor bersepta atau tidak bersepta yang muncul dari kaki sel, sterigmata sederhana atau kompleks, berwarna atau tidak berwarna, konia berbentuk rantai berwarna hijau, coklat atau hitam, tumbuh baik pada suhu 37½ °C atau di atasnya.

A. glaucus dan *repens* jamur kontaminan pada makanan yang mempunyai kandungan gula dan garam tinggi dan mampu tumbuh pada kadar air yang rendah.

A. niger, perusak buah seperti jeruk, apel dan sayuran seperti seperti bawang merah dan putih, tetapi dapat dipergunakan untuk industri asam glukonat.

A. clavatus menghasilkan zat antibiotika clavasin.

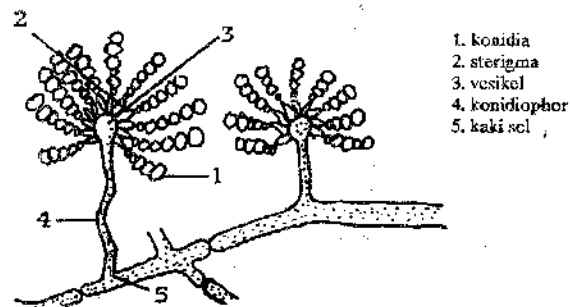
A. oryzae dan *A. sojae* dipergunakan untuk pembuatan kecap dan shoyu, bersifat proteolitik dan amilolitik.

A. flavus, *A. parasiticus* dikenal sebagai penghasil aflatoksin.

A. ochraceus dapat menghasilkan ochratoksin dan *A. versicolor* (*A. nidulans*) penghasil toksin sterigmatocystin, ketiga jenis toksin tersebut bisa bersifat karsinogenik.

Jenis Aspergillus lain yang juga bersifat toksis adalah :

A. fumigatus, *A. chevalieri*, *A. wentii*, *A. ostianus*, *A. ruber*, *A. niveus*, *A. terreus* dan *A. flavipes*.



Gambar 3.5. *Aspergillus* sp

Genus *Penicillium*, dibedakan atas empat kelompok berdasarkan pada bentuk badan buah (spore head), yaitu penicili sederhana (monoverticilata), dua penisili (biverticilata) dan penilli yang kompleks terdiri atas poliverticilata simetris dan polivertisilata asimetris. Jenis yang banyak terdapat dalam bahan pangan adalah penicilli kompleks yang asimetris. Sebagian besar genus penicillium bersifat perusak pada beberapa jenis sayuran, buah, sereal dan kacang-kacangan dan bersifat toksis.

Sifat-sifat morfologis penicillium : bersepta, miseliia bercabang biasanya tidak berwarna, konidiophor bersepta keluar dari permukaan hifa yang bercabang atau tidak bercabang badan buah berbentuk seperti sapu yang diikuti dengan sterigmata dan konidia yang tersusun seperti rantai pada permukaan sterigmata, konidia pada hampir semua spesies kalau masih muda berwarna hijau dan kemudian berubah menjadi kecoklatan.

P. expansum : spora berwarna hijau kebiruan, penyebab pembusukan pada buah.

P. digitatum : spora berwarna hijau kekuningan, penyebab pembusukan pada buah jeruk.

P. italicum : konidia berwarna hijau kebiruan, merupakan kontaminan dan perusak pada buah jeruk.

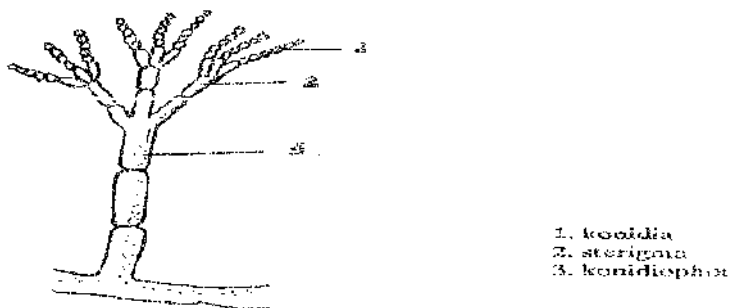
P. roqueforti dan *p. camemberti* dipergunakan untuk pemeraman keju sehingga dihasilkan flavor spesifik.

P. islandicum dan *p. funiculosum* bersifat toksia karena menghasilkan luteoskyrin dan cyclochlorotin

P. citrium menghasilkan toksin citrinin.

P. citreo-viride penyebab toksin citreoviridin.

Spesies lain yang bersifat toksin adalah : *P. purberulum*, *P. patulum*, *P. griseofulvum*, *P. rubrum*, *P. purpurogenus*, *P. rugulosum*, *P. notatum*, *P. viridicantum*, *P. cabescens* dan masih beberapa spesies lain yang juga dapat menyebabkan toksis baik pada manusia maupun hewan.



Gambar 3.6. *Penicillium* sp

3.3. KHAMIR

Khamir adalah fungi uniseluler yang bersifat mikroskopik, pada beberapa genus ada yang membentuk miselia dengan percabangan, dan ada yang berkembang biak secara “budding”. Khamir dapat bersifat merusak atau membantu proses pengolahan pangan. Khamir banyak dipergunakan untuk pembuatan roti, bir, anggur (wine), vinegar (asam cuka), dan cuka untuk makanan ternak atau sebagai protein sel tunggal. Sedangkan jenis khamir yang bersifat perusak terdapat pada sauerkraut, sari buah, sirup, tetss, masu, jelli, daging, wine, bir dan beberapa makanan lain.

Sifat-sifat morfologi khamir dapat diketahui secara mikroskopis meliputi bentuk dan ukuran sel, sifat reproduksi, sifat kultural serta struktur sel.

Beberapa bentuk khamir, diantaranya ialah berbentuk bulat atau *spheroid*, elips atau bulat telur, batang atau silindris, seperti buah jeruk (lemon). Bentuk sel khamir tetap sehingga dapat membantuk untuk identifikasi. Ukuran sel khamir berkisar antara 1 – 9 mikron kali 2 – 20 mikron, tergantung pada spesiesnya. Khamir tidak mempunyai flagela sehingga tidak dapat melakukan gerakan aktif.

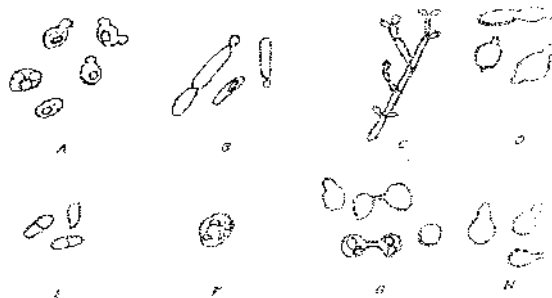
Khamir dapat berkembang biak secara bertunas (budding), pembelahan, pembentukan spora aseksual, konjugasi atau reproduksi seksual dan secara partenogenesis. Tetapi yang sering terjadi adalah secara bertunas (budding). Pembentukan tunas terjadi setelah sel mencapai ukuran tertentu. Fase pembentukan tunas adalah centrosom membentuk tonjolan yang mendesak sitoplasma sehingga terjadi tonjolan pada sel. Tonjolan tersebut kemudian tumbuh menjadi besar yang diikuti dengan masuknya bagian-bagian inti ke dalam tonjolan. Setelah tonjolan tersebut menjadi sel anakan dan cukup dewasa maka segera melepaskan diri.

Kenampakan pertumbuhan sel khamir pada semua bagian media penting untuk identifikasi, misalnya terbentuknya lapisan tipis (film) menunjukkan adanya khamir jenis oksidatis atau “film yeast”, sedang khamir yang berwarna adalah genus *Rhodoterpillula* warnanya oleh karotenoid. Hampir semua khamir pada waktu selnya masih muda kelihatan berair atau membentuk lendir, berwarna putih, agak krem atau merah muda, setelah tua selnya maka kelihatan kering dan keriput.

Khamir dapat bersifat oksidatif dan fermentatif. Pada khamir oksidatif tumbuh di permukaan cairan dan membentuk lapisan tipis, sehingga disebut sebagai “film yeast”. Seding khamir yang bersifat fermentatif biasanya tumbuh di dalam cairan.

Sifat-sifat fisiologis khamir : secara umum kebutuhan akan air lebih sedikit dibandingkan dengan bakteri pada umumnya, beberapa jenis khamir membutuhkan air lebih banyak dibandingkan dengan jamur. Jenis khamir tertentu mempunyai persyaratan a_w yang rendah yaitu yang tergolong dalam osmofilik. Interval a_w untuk pertumbuhan secara normal adalah : 0.88 – 0.94, sedang untuk khamir osmofilik antara 0.62 – 0.65. Suhu pertumbuhan khamir yang optimal antara 25 – 30½ °C, maksimum suhu pertumbuhan : 35 – 47½ °C. pH optimum

antara 4.0 – 4.5, dan tidak dapat tumbuh baik pada media yang bersifat alkalis. Khamir tumbuh baik pada suasana aerob, tetapi untuk jenis fermentatif dapat tumbuh secara anaerob, walaupun secara lambat. Secara umum gula merupakan sumber enersi yang paling baik, hanya untuk jensi khamir oksidatif dapat menggunakan asam organik dan alkohol. Penggunaan sumber N untuk pertumbuhan dengan penambahan amonia, urea atau polipeptida.



Gambar 3.7. Bentuk-bentuk sel khamir :

A. *Sacharomyces cerevisiae*. B. *Candida* dengan sel yang memanjang, C. *Candida* menunjukkan pseudomiselia, D. Khamir berbentuk jeruk (lemon-shaped yeast), E. *Schizosaccheromyces*, F. *Hansenulla*, G. *Zygossaccharomyces*, H. Khamir bentuk cawan

Pengelompokan khamir berdasarkan sifat-sifat pertumbuhannya pada bahan pangan, meliputi:

1. **“Film yeast”** : *Pichia*, *Hansenulla*, *Debaryomyces*, *Candida* dan *Trichosperon*, biasanya tumbuh pada permukaan makanan asam, seperti sauerkraut dan pickles, bersifat mengoksidasi asam organik, dan bersifat toleran terhadap asam. *Hansenulla* dan *Pichia* toleran terhadap kadar alkohol yang tinggi dan dapat mengoksidasi alkohol dalam minuman beralkohol. *Pichia* banyak didapat merusak wine dan dapat menghasilkan flavor tertentu. *Debaryomyces* bersifat sangat toleran terhadap kadar garam tinggi dan dapat tumbuh pada konsentrasi garam sampai 24%. Jenis film yeast tidak menghasilkan atau sedikit sekali alkohol dan asam volatil.

2. **“Apiculate” atau “lemon shape yeast”**: *Sacchomycodes*, *Hanseniospora*, *Nadsodia* dan *Kloeckera* merupakan golongan yang bersifat merusak fermentasi wine dan menyebabkan off-flavor, menghasilkan alkohol rendah, dan asam volatil tinggi.
3. **“Osmofilic yeast”** yaitu jenis yang tahan terhadap kadar gula dan garam tinggi. Persyaratan pertumbuhan untuk a_w sebesar 0.62 – 0.65 dan ada yang sekitar 0.78. Yang tergolong dalam golongan ini adalah : *Saccharomyces rouxii* dan *S. mellis* penyebab kerusakan pada buah yang dikeringkan, konsentrat sari buah, madu dan bahan lain yang berkadar gula tinggi. “Salt tolerant yeasty” dapat tumbuh pada daging yang diasinkan, ikan asin, misa, kecap, shoyu. Hampir semua yang bersifat “salt tolerant” biasanya bersifat “film yeast”. Yang termasuk golongan ini adalah : *Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon*.
4. **“Alkohol yeast”** yaitu jenis khamir yang berperan dalam fermentasi alkohol, yang terkenal adalah genus *Saccharomyces*.
5. **“Lactose fermenting yeast”** yaitu jenis yeast yang mampu melakukan fermentasi laktosa pada susu, yang telah dikenal adalah *Saccharomyces fragilis* dan *S. lactis*.
6. **“Food dan feed yeast”** yaitu jenis yeast yang dipergunakan untuk bahan pangan pakan, biasanya dalam bentuk protein sel tunggal (PST).

3.4. BAKTERI

Bakteri merupakan mikrobial uniseluler yang termasuk kelas *Schizomyces*. Pada umumnya bakteri tidak mempunyai klorofil dan reproduksi aseksual secara pembelahan transferal atau biner. Berdasarkan sifat-sifatnya, bakteri dapat dibedakan atas dua golongan yaitu bakteri sejati (termasuk ordo Eubacteriales) dan bakteri tingkat tinggi (ordo, Mixobakteriales, Actinomycetales dan Chlamydobakteriales).

Sifat-sifat bakteri yang penting adalah bersifat saprofit atau parasit, patogen terhadap manusia atau hewan atau tumbuh-tumbuhan. Berdasarkan bentuk bakteri, dapat dibedakan atas tiga macam yaitu berbentuk bulat atau coccus, bentuk batang atau silindris atau bentuk lengkung.

Sifat morfologis dapat dipergunakan untuk membantu identifikasi bakteri yang dilakukan secara mikroskopis dengan melihat bentuk, ukuran, terbentuknya agragat, struktur dan reaksi pengecatan.

Sifat-sifat morfologis yang spesifik diantaranya :

1. Pembentukan kapsula (encapsulation)

Adanya kapsula atau lendir yang dikeluarkan oleh bakteri selama pertumbuhan menyebabkan pelendiran pada permukaan makanan. bakteri pembentuk kapsula dan lendir mempunyai sifat lebih tahan terhadap panas dan reagensia tertentu. Terbentuknya lendir dan kapsula tergantung pada pertumbuhan bakteri sehingga faktor-faktor pertumbuhan juga ikut menentukan.

2. Pembentukan endospora

Bakteri pembentuk endospora adalah genera *Bacillus* dan *Clostridium*. Spora yang dibentuk dari spesies yang berbeda bahan dari strain yang berbeda mempunyai sifat ketahanan terhadap panas dan reagensia tertentu juga berbeda, kesemuanya lebih tahan dibandingkan dengan sel vegetatifnya.

Pembentukan spora terjadi pada waktu mencapai fase pertumbuhan “late logarithmic” yaitu pada saat makanan sel hampir habis atau selnya telah tua. Terbentuknya spora dapat ditunjukkan dengan penambahan bahan kimia tertentu sehingga dapat terlihat pertambahan jumlah DNA sel selama sporulasi. Pembentukan spora terjadi pada interval pH tertentu (lebih sempit dibandingkan dengan untuk pertumbuhan sl), adanya oksigen yang cukup untuk bakteri aerob dan tidak adanya oksigen untuk bakteri anaerob, interval suhu juga lebih sempit dibandingkan untuk pertumbuhan, adanya ion logam tertentu seperti Mn^{++} , tidak terdapat zat penghambat seperti asam lemak, cukup glukosa dan tersedianya nitrogen.

Selama sporulasi protein sel dirubah menjadi protein spora, terbentuknya enzim tertentu, asam dipikolinat (DPA), glukosamin dan asam muramat.

Perkecambahan spora dapat terjadi pada umumnya bila kondisi sesuai dengan kondisi pertumbuhan sel vegetatif, tetapi masih memerlukan kondisi tertentu misalnya pada suhu rendah spora tidak

dapat berkecambah. Perkecambahan spora dapat dipercepat dengan adanya jenis asam amino tertentu yaitu 1 – alanin, adenosin, 1 – sistein, 1 – valin, adanya ion Mg^{++} dan Mn^{++} , glukosa, asam dipikolinat dan ion Ca^{++} . Dengan pemanasan yang bersifat “heat shocking / heat activation” dapat mengaktifkan enzim-enzim dormat. Suhu optimal dan waktu pemanasan tersebut tergantung pada sifat bakteri pembentuk spora, untuk bakteri termofil suhunya lebih tinggi dibandingkan dengan mesofil. Perkecambahan dapat dihambat dengan penambahan asam sorbat pada pH asam, dengan penambahan zat yang bersifat kation divalen, pati, asam oleat dan asam llinoleat.

“Dormancy” spora dapat diartikan sebagai masa perpanjangan waktu perkecambahan spora karena kondisinya kurang sesuai, misalnya adanya zat penghambat atau kekurangan nutien utama seperti asam-asam amino. Beberapa spora dapat berkecambah tetapi tidak dapat tumbuh karena rusak oleh pemanasan, penyinaran dan adanya agensia tertentu. Perpanjangan waktu berkecambah spora dari beberapa hari sampai beberapa bulan, sebagai contoh pada spora *Bacillus megaterium* mempunyai waktu dormancy selama 3 – 4 bulan, sedang *Clostridium botulinum* dari 15 hari – 72 bulan.

3. Pembentukan agregat sel

Beberapa jenis bakteri dapat membentuk rantai panjang dan bergandengan antara satu sel dengan lainnya, bergerombol sehingga membentuk suatu agregat. Pembentukan agregat tersebut juga memerlukan kondisi tertentu. Jenis bakteri pembentuk agregat lebih tahan terhadap pemanasan dan agensia tertentu dibandingkan yang terpisah.

Sifat kultural bakteri pangan

Pertumbuhan bakteri pada bahan pangan menyebabkan kenampakan yang kurang menyenangkan karena terbentuknya warna atau terjadi perubahan warna. Selain dapat membentuk warna sehingga berpengaruh terhadap warna bahan pangan, juga ada yang dapat membentuk lapisan tipis (film) pada permukaan cairan, dapat membentuk lendir. Pertumbuhan sel bakteri didalam substrat cair dapat menyebabkan kekeruhan atau pengendapan.

Sifat-sifat fisiologis bakteri pangan

Adanya pertumbuhan bakteri pada bahan pangan menyebabkan perubahan-perubahan baik yang bersifat kimiawi maupun biokimiawi bahan bahkan dapat terjadi perubahan fisis. Perubahan tersebut meliputi hidrolisa komponen-komponen yang bersifat kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana, sebagai contoh protein dapat dihidrolisa menjadi polipeptida, asam amino, amonia dan amina, lemak menjadi gliserol dan asam lemak. Reaksi oksidasi reduksi yang dilakukan oleh bakteri untuk pengambilan energi bahan pangan sehingga dapat menghasilkan asam-asam organik, alkohol, aldehid, keton dan gas.

Faktor-faktor yang bersifat menghambat aktifitas bakteri dan pertumbuhan perlu diperhatikan untuk pengawetan bahan pangan. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri adalah jenis atau macam makanan / substrat, air, suhu, konsentrasi ion H (pH), potensial reduksi dan oksidasi dan adanya zat-zat yang bersifat penghambat.

Masing-masing jenis bakteri mempunyai persyaratan tertentu terhadap kebutuhan makanan (nutrien). Secara umum jika jenis makanan sesuai dengan pertumbuhan bakteri maka interval suhu, pH dan a_w lebih luas. Beberapa jenis bakteri dapat mempergunakan berbagai jenis karbohidrat misalnya bakteri Coliform dan Clostridium, sedang pada pseudomonas hanya mampu tumbuh pada satu atau dua jenis karbohidrat saja. Kebutuhan vitamin untuk masing-masing jenis bakteri juga berbeda, bahkan ada yang dapat mensintesa vitamin (*Staphylococcus aureus*, *Klesiella*) sedang jenis lain mutlak mempergunakan vitamin (*Pseudomonas* dan *Escherichia*).

Kebutuhan air untuk pertumbuhan bakteri dinyatakan dalam nilai a_w bahan pangan masing-masing jenis berbeda. Untuk semua jenis bakteri relatif membutuhkan a_w yang lebih besar dibandingkan dengan jenis jamur dan khamir, bahkan jenis bakteri dapat tumbuh baik pada a_w mendekati 1,00 (0,995 – 0,998), berarti mempunyai kadar garam dan gula yang rendah. Pada medium yang berkadar gula 3 – 4 persen dan garam sebesar 1 – 2 persen mungkin sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri, persyaratan a_w untuk jenis bakteri *pseudomonas* sebesar 0,97; *Achromobacter* sebesar 0,96; *Escherichia coli* 0,96; *Bacillus subtilis* 0,95;

Teori Dan Aplikasi ...

Aerobacter aerogenes 0.945; *Staphylococcus* 0.86 dan *Clostridium* 0.95. Beberapa bakteri dapat tumbuh pada a_w kurang dari 0.90.

Masing-masing bakteri mempunyai suhu optimal, minimal dan maksimal untuk pertumbuhan. Berdasarkan suhu pertumbuhan tersebut maka bakteri dapat digolongkan atas tiga golongan yaitu bakteri *psikrofil*, tumbuh baik pada suhu rendah dan mempunyai interval suhu pertumbuhan antara $0 - 15\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$; bakteri *mesofil*, tumbuh baik pada suhu $20 - 45\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$; dan bakteri *termofil*, tumbuh baik pada suhu $45 - 65\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$.

Konsentrasi ion H pada medium pertumbuhan bakteri dinyatakan dalam pH untuk masing-masing bakteri juga berbeda, dan masing-masing mempunyai pH minimal, optimal dan maksimal untuk pertumbuhan. Hampir semua jenis bakteri tumbuh baik pada pH sekitar netral (pH 7.0).

Potensial oksidasi dan reduksi dapat membedakan antara bakteri yang bersifat *aerobik* yaitu yang membutuhkan oksigen bebas untuk pertumbuhannya, bakteri *anaerobik* yaitu yang tidak membutuhkan oksigen bebas dan tumbuh baik bila tanpa oksigen, dan yang tergolong *fakultatif* yaitu yang dapat tumbuh dengan adanya oksigen dan tanpa oksigen. Bakteri yang bersifat *mikroaerofilik* yaitu bakteri yang pertumbuhannya membutuhkan sangat sedikit oksigen bebas. Zat-zat yang bersifat oksidatif dan reduktif dalam medium dapat bersifat menghambat pertumbuhan bakteri.

Produk yang dihasilkan oleh bakterial selama pertumbuhan dapat menghambat pertumbuhan bakteri itu sendiri. Beberapa jenis makanan telah mempunyai zat yang bersifat menghambat pertumbuhan, misalnya adanya asam benzoat, asam sitrat dan askorbat dalam buah dapat menghambat pertumbuhan. Penambahan zat-zat tertentu selama pengolahan juga dapat menyebabkan penghambatan pertumbuhan bakteri, misalnya propionat selain menghambat jamur juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Bacteriophage adalah virus yang dapat menyebabkan penghancuran sel-sel bakteri. Sampai sekarang penggunaan bacteriophage untuk membunuh bakteri dalam proses pengolahan makanan masih belum dilakukan karena masih belum banyak ditemukan peranan bacteriophage. Yang telah diketahui adalah jenis bacteriophage penyebab penyakit bakteri asam laktat yang dipergunakan starter pada pembuatan

keju atau buttermilk. Beberapa jenis phage lain juga telah ditemukan dalam industri antibiotika jenis treptomisin dan industri aseton dan butil alkohol.

Genera-genera bakteri yang penting dalam bidang pangan

Sifat-sifat spesifik masing-masing genera yang penting dalam pengolahan maupun merusak makanan penting diketahui. Penggolongan bakteri menurut klasifikasi dari “Bergeys manual of Determinative of Bacteriologi”.

Semua bakteri pangan tergolong dalam klas *Schizomycetes*, dan hampir semuanya tergolong dalam ordo *Pseudomonadales* dan *Eubacterieles*. Dari golongan bakteri tingkat tinggi yang terkenal di bidang pangan yaitu ordo *Actinomycetales* dan *Chlamydobacteriales*. Familia bakteria yang penting dalam bidang pangan adalah : *Pseudomonadaceae*, *Spirillaceae*, *Achromobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Brevibacteriaceae*, *Lactoba-cillaceae*, *Propionibactericeae*, *Corynebacteri-ceae*, dan *Bacilaceae*.

Bab 4

PENANAMAN MIKROBA

4.1. PENDAHULUAN

Satu tujuan setiap bidang ilmiah ialah organisasi dan interpretasi informasi faktual yang ditemukan dalam bidang tersebut. Demikian pula halnya dengan mikrobiologi. Bagaimanakah mengelompokkan banyak macam mikroorganisme itu ke dalam suatu pola, atau sistem teratur, yang mengenali persamaan-persamaan di dalam suatu kelompok dan perbedaan-perbedaan di antara kelompok-kelompok tersebut ? Penelaahan mengenai organisme untuk memantapkan suatu sistem klasifikasi yang mencerminkan dengan sebaik-baiknya semua kesamaannya dan kelainannya itu dinamakan *taksonomi*. Sekali suatu organisme dimasukkan ke dalam suatu kelompok taksonomik, maka menjadi mudah untuk memberikan nama kepadanya. Penamaan mikroorganisme (*nomenklatur*) menyajikan label atau pegangan untuk acuan dan komunikasi yang tidak menyulitkan.

Untuk mengembangkan skema klasifikasi yang memadai, kita harus mengerti sepenuhnya sifat-sifat atau ciri-ciri subjeknya-dalam hal ini mikroorganismenya-yang akan kita klasifikasikan. Dalam bab sebelumnya telah dibahas ciri-ciri utama mikroorganisme. Dalam bab ini akan diperkenalkan klasifikasinya. Sebagai contoh akan dikemukakan skema klasifikasi untuk bakteri; ingatlah bahwa sistem klasifikasi untuk semua mikroorganisme agak serupa.

4.2. KLASIFIKASI MIKROORGANISME

Klasifikasi ialah suatu istilah yang berkaitan dengan dan terkadang digunakan secara dapat dipertukarkan dengan taksonomi. Taksonomi ialah ilmu mengenai klasifikasi atau penataan sistematis organisme ke dalam kelompok atau kategori yang disebut *taksa* (tunggal : *takson*). Akan tetapi, penyusunan taksonomik mikroorganisme mensyaratkan mereka diiden-

tifikasi sebagaimana mestinya dan diberi nama. Kegiatan seluruhnya-pengklasifikasian, penamaan, dan pengiden-tifikasian—disebut *sistematika mikroba*. Ketiga proses ini sebagaimana dijelaskan berikut ini, amat saling bergantung.

1. **Taksonomi (klasifikasi)** : Penataan teratur unit-unit ke dalam kelompok satuan yang lebih besar. Hal ini dapat diibaratkan dengan permainan kartu. Kartu-kartu dapat dipilih mula-mula berdasarkan rupanya; kemudian di dalam setiap rupa, kartu-kartu itu dapat disusun menurut nomor urutnya, dengan kartu yang bergambar muka (raja, ratu dan pangeran) ditempatkan berurutan.
2. **Nomenklatur** : Penamaan satuan-satuan yang dicirikan dan dibatasi oleh klasifikasi. Dapat digunakan analogi yang sama. Kartu-kartu yang bergambar muka diberi nama dan mungkin bahkan lebih dari satu nama. Misalnya, "jack" atau "knave" menunjukkan kartu yang sama. Untunglah, nomenklatur ilmiah dalam semua bahasa itu sama.
3. **Identifikasi** : Penggunaan kriteria yang ditetapkan untuk klasifikasi dan nomenklatur tersebut di atas untuk mengidentifikasi mikro-organisme dengan membanding-bandingkan ciri-ciri yang ada pada satuan yang belum diketahui dengan satuan-satuan yang sudah dikenal. Identifikasi mikroorganisme yang baru diisolasi memerlukan pencirian, deskripsi, dan perbandingan yang cukup, dengan deskripsi yang telah dipublikasikan untuk jasad-jasad renik lain yang serupa.

Sebagaimana telah dikemukakan sebelumnya, maksud sistem klasifikasi ialah mengelompokkan organisme sedemikian hingga mencerminkan semua kesamaan maupun kelainannya. Dari klasifikasi maka ditentukanlah kriteria yang perlu untuk identifikasi mikroorganisme. Klasifikasi juga memberikan suatu cara untuk menentukan kekerabatan evolusioner di antara kelompok-kelompok jasad renik dan untuk memilih mikroorganisme yang mungkin memiliki ciri-ciri atau kemampuan yang menarik perhatian secara khusus, misalnya menghasilkan antibiotik.

Sebelum tahun 1700, organisme yang dapat tampak dengan mata bugil diklasifikasikan sebagai tumbuhan atau binatang saja. Praktek ini diterima para ahli biologi sebagai dasar pemisahan dunia hidup menjadi dua dunia, *Animalia* dan *Plantae*. Dalam tahun 1750-an kedua dunia itu

dibagi lagi menjadi pengelompokan yang dapat diidentifikasi dan yang berkerabat oleh Carolus Linnaeus, seorang naturalis dari Swedia. Suatu ciri yang amat penting pada skema Linnaeus ini masih digunakan sampai kini yaitu *nomenklatur sistem biner* (dua bagian). Mengenai penamaan ini akan dibahas lebih lanjut kemudian.

Sistem klasifikasi biasanya dikembangkan melalui kerja sama internasional di antara para ilmuwan. Dengan menggunakan skema Linnaeus ini, dikembangkan sistem-sistem klasifikasi bagi dunia tumbuhan oleh para botaniwan dan untuk dunia binatang oleh para zoologiwan. Algae dan fungi dimasukkan ke dalam dunia tumbuhan dan protozoa ke dalam dunia binatang. Banyak sistem klasifikasi bakteri dikembangkan dengan model-model yang didasarkan pada skema-skema yang lebih tua ini. Dalam dasawarsa terakhir ini diusulkan skema klasifikasi untuk virus karena pada waktu itu telah terkumpul cukup data untuk menjadi dasar skema klasifikasi seperti itu.

4.3. KONSEP MENGENAI SPESIES

Satuan atau kelompok dasar dalam semua sistem klasifikasi organisme, termasuk mikroorganisme, ialah *spesies*. Istilah ini sering dipakai - tetapi terlampaui sering dengan perasaan autoritas yang tak dapat dibenarkan. Yang benar ialah bahwa konsepsi spesies itu agak dibuat-buat dan tidak didefinisikan secara tepat, demikian pula hal itu biasanya bersifat subjektif (didasarkan pada pertimbangan individu) dalam bidang mikrobiologi. Pada umumnya, spesies didefinisikan sebagai suatu kelompok individu yang berkerabat dekat yang (1) dapat dibedakan dari individu-individu kelompok lain yang serupa dan (2) semuanya dapat saling dipertangkarkan ("interbreeding") dengan anggota-anggota lain dalam kelompok tersebut. Patokan untuk saling penangkaran itu dapat dengan mudah dan secara rutin diterapkan pada mikroorganisme, terutama bakteri. Jadi bagian terakhir definisi yang disebut di atas itu tidak sesuai, dan kita harus kembali pada penaksiran yang terdidik atau didasarkan pengalaman oleh seorang peneliti tentang seberapa banyak persamaan sekelompok mikroorganisme seharusnya agar dapat disebut spesies. Maka hal ini merupakan keputusan subjektif yang diambil oleh mikrobiologiwan. Dengan demikian, semakin lengkap pencirian suatu mikroorganisme,

semakin baik pula pertimbangan mengenai apa yang menjadikan suatu spesies.

4.4. KATEGORI TAKSONOMI

Sistem klasifikasi biologi didasarkan pada hierarki taksonomi atau penataan kelompok atau kategori yang menempatkan spesies pada satu ujung dan dunia di ujung lainnya dalam urutan sebagai berikut :

- Spesies* : Sekelompok organisme berkerabat dekat (untuk tujuan kita jasad renik) yang individu-individunya di dalam kelompok itu serupa dalam sebagian terbesar ciri-cirinya.
- Genus* : Sekelompok spesies yang serupa.
- Famili* : Sekelompok genus yang serupa.
- Ordo* : Sekelompok famili yang serupa.
- Kelas* : Sekelompok ordo yang serupa.
- Filum* atau divisi : Sekelompok kelas yang berkerabat.
- Dunia* : Seluruh organisme di dalam hierarki ini.

Penataan spesies ke dalam sistem klasifikasi - misalnya, spesies → genus → famili → ordo → kelas → filum atau divisi - mungkin tampaknya relatif mudah dan tidak meragukan. Tidaklah demikian, seberapa jauhkah keserupaan spesies itu seharusnya jika akan dimasukkan ke dalam genus yang sama ? Apa batas-batas bagi setiap genus khusus, atau famili, atau ordo ? Pertanyaan-pertanyaan ini tidak dapat dijawab secara mutlak. Tambahan pula, taksa yang berlainan tidak selamanya sama bergunanya. Misalnya, dewan penyunting *Bergey's Manual* edisi ke 8 berkesimpulan bahwa "bagi sebagian besar kelompok bakteri, genus dan spesies merupakan satu-satunya kategori yang kini dapat dikenali (diterima) dan didefinisikan dengan ketepatan yang memadai". Cara bertumpang tindihnya sifat-sifat bakteri di antara spesies menghalangi penentuan batas-batas tajam bagi demarkasi di antara kelompok-kelompok taksonomik.

Kategori spesies merupakan kelompok terpenting dalam skema klasifikasi ini. Hal itu memberikan landasan bagi seluruh struktur hierarki tersebut.

4.5. PENAMAAN MIKROORGANISME-NOMENKLATUR SISTEM BINER

Mikroorganisme, sebagaimana bentuk-bentuk kehidupan yang lain, diberi nama menurut *nomenklatur sistem biner* (Tabel 2-1). Tujuan utama suatu nama ialah memberi cara pengacuan suatu mikroorganisme, dan bukanlah untuk memeriksanya. Setiap organisme ditandakan dengan nama genus dan istilah biasa atau deskriptif yang disebut epitet spesies, keduanya itu bahasa Latin atau dilatinkan. Nama genus selalu ditulis dengan huruf besar; epitet spesies selalu dengan huruf kecil. Kedua komponen tersebut bersama-sama disebut nama ilmiah (genus dan epitet spesies) dan selalu dicetak miring - misalnya *Neisseria gonorrhoeae*, bakteri yang menyebabkan penyakit gonorea.

Tabel 4.1. Contoh untuk nama-nama taksonomi sebagaimana di terapkan bagi spesies dalam dunia hewan, tumbuhan, dan mikroba

TAKSA	CONTOH TAKSA			
	Singa*	Dandelion*	Amoeba*	Basil Tuberkel*
Dunia	Animalia	Plantae	<i>Prostita</i>	Procaryotae
Filum	Chordate	Traceophyta	<i>Sarcodina</i>	Bacteria
(atau divisi)	Mammalian	Angiospermae	<i>Rhizopoda</i>	
Kelas	Carnivore	Campanulales	<i>Amoebida</i>	Actinohomycetes
Ordo	Felidae	Compositae	<i>Amoebidae</i>	Mycobacteriaceat
Famili	Felis	Taraxacum	<i>Amoeba</i>	Myobacteriaceae
Genus	F. leo	<i>T. Pfficinale</i>	<i>A. proteus</i>	M. tuberculosis
Spesies				

* Nama biasa / umum

a. Kode (Sandi) Nomenklatur

Agar memperoleh penamaan yang konsisten dan seragam bagi organisme, telah ditentukan peraturan yang diterima secara internasional untuk penamaan organisme dan diikuti oleh para biologiwan di semua negara. Peraturan seperti itu untuk tumbuhan dan hewan ditetapkan pada awal tahun 1900 oleh para ahli botani dan zoologi. Sandi internasional untuk, Nomenklatur Zoologi untuk pertama kali diterbitkan dalam tahun 1901; Sandi Internasional bagi Nomenklatur Botani untuk pertama kali terbit pada tahun 1906. Dalam tahun 1947 Gabungan Internasional

Perhimpunan Mikrobiologi memakai Sandi Internasional untuk Bakteri dan Virus. Sandi itu, kini dikenal dengan Kode Internasional Nomenklatur Bakteri, secara sinambung dimodifikasi dalam suatu usaha untuk memperbaiki dan menjelaskan peraturan dan pengaturannya. Edisi yang paling mutakhir diterbitkan dalam tahun 1975.

b. Prinsip Nomenklatur

Sandi-sandi dalam zoologi, botani, dan bakteriologi didasarkan pada beberapa prinsip yang umum. Beberapa di antaranya yang paling penting ialah:

1. Setiap macam organisme yang nyata disebut sebagai spesies.
2. Spesies ditandai dengan kombinasi biner Latin, maksudnya untuk memberinya label yang seragam dan dipahami secara internasional.
3. Nomenklatur organisme diatur oleh organisasi pengawas internasional yang sesuai-dalam hal bakteri, "*The International Association of Microbiological Societies*".
4. Hukum prioritas menjamin penggunaan nama sah tertua yang tersedia bagi suatu organisme. Hal ini berarti bahwa nama yang pertama-tama diberikan kepada mikroorganisme itulah nama yang benar, asalkan mengikuti prosedur yang semestinya.
5. Penunjukan kategori diperlukan untuk klasifikasi organisme.
6. Kriteria ditetapkan untuk pembentukan dan publikasi nama-nama yang baru.

c. Nama Ilmiah dan Nama Umum

Nama ilmiah bagi organisme dibentuk sesuai dengan peraturan nomenklatur sistem biner sebagaimana telah dikemukakan sebelumnya. Organisme yang telah kita kenal dan acapkali kita sebut-sebut biasanya mempunyai nama umum. Beberapa contoh organisme yang kerap kali disebut-sebut dengan nama umumnya itu terdaftar di bawah ini, bersama-sama dengan nama ilmiahnya. (Dalam banyak hal nama umum digunak-an sebelum diberikan nama ilmiahnya).

NAMA UMUM	NAMA ILMIAH
Anjing	<i>Canis familiaris</i>
Lalat rumah	<i>Musca domestica</i>
Oak putih	<i>Quercus alba</i>
Kapang roti	<i>Neurospora crassa</i>
Gonokokus	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Basil tuberkulosa	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Keuntungan menggunakan nama-nama umum ialah kemudahannya dan komunikasi yang lebih efektif antara dokter dan pasiennya. Sebagai contoh, pada percakapan di laboratorium atau dengan orang awam maka lebih mudah untuk menyebut agen penyebab penyakit TBC sebagai "basil tuberkulosa" dan bukannya *Mycobacterium tuberculosis*. Nama umum terkadang diturunkan dari nama genus, misalnya pseudomonad dari *Pseudomonas*.

4.6. PERKEMBANGAN MUTAKHIR DALAM TAKSONOMI MIKROBA

Taksonomi mikroba bukanlah subjek yang statis. Skema klasifikasi terus-menerus berubah secara perlahan karena diperoleh lebih banyak informasi dan karena dikembangkan berbagai metode untuk menafsirkan data. Dua perkembangan yang relatif baru telah muncul untuk digunakan dalam taksonomi mikroba yang dalam berbagai cara akan membuat keputusan-keputusan yang lebih objektif. Salah satu di antaranya ialah taksonomi numeris, dan yang lainnya ialah taksonomi genetik.

a. Taksonomi Numeris

Taksonomi numeris, yang juga dinamakan *taksonomi komputer*, didasarkan pada asas-asas yang dipublikasikan bertahun-tahun yang lalu dan barulah belakangan ini diterapkan bagi taksonomi mikroba. Taksonomi numeris mensyaratkan tersedianya sejumlah besar informasi mengenai mikroorganisme yang bersangkutan sebanyak mungkin informasi mengenai ciri-ciri yang tidak berkaitan yang mungkin diperoleh. Setiap ciri diberi bobot yang sama dalam membentuk taksa. Kesamaan

menyeluruh didasarkan pada proporsi ciri-ciri yang dipunyai bersama. Dalam praktek mikrobiologiwan menghimpun data untuk setiap biakan. Dengan menggunakan komputer maka data setiap biakan itu dibandingkan dengan data setiap biakan yang lain. (Diperlukan bantuan suatu komputer berkecepatan tinggi karena kalau tidak maka ribuan perbandingan ciri-ciri yang beragam itu akan memakan waktu yang terlampau lama). Hasil akhirnya ialah bahwa ahli mikrobiologi itu dapat menghitung dengan angka, derajat kesamaan setiap biakan terhadap setiap biakan yang lain. Taksa ditetapkan berdasarkan derajat kesamaan yang disetujui. Taksonomi numeris memberi dua keuntungan. Pertama, dapat dibuat objektif : prasangka (bias) taksonomiwan tidak terbawa di dalam prosedur, sehingga hasilnya (jika prosedurnya diterapkan dengan benar) tidak terbuka untuk dipertentangkan. Keuntungan besar yang lainnya taksonomi numeris itu ialah bahwa hasil penemuannya dapat diulang-ulang: taksonomiwan yang lain yang mengikuti prosedur yang sama dengan data yang sama akan memperoleh hasil yang sama pula.

b. Taksonomi Genetik

Sebagaimana sudah banyak diketahui mengenai bahan genetik bakteri, yaitu DNA. Dengan prosedur laboratorium yang telah tersedia, orang dapat menentukan komposisi basa (kandungan guanin plus sitosin. atau GS) DNA suatu mikroorganisme tertentu dan kemudian membandingkannya dengan komposisi basa DNA pada mikroorganisme lainnya, Derajat kekerabatan atau kesamaan DNA pada berbagai mikroorganisme dapat ditentukan pula dengan percobaan hibridisasi. Dalam teknik ini utasan tunggal DNA mikroorganisme dipertemukan dengan utasan tunggal DNA mikroorganisme yang lain, Derajat penyatuan kembali utasan-utasan tunggal ini mencerminkan derajat kesamaannya.

c. Pengubahan Konsepsi Taksonomi

Sekali mikroorganisme ditetapkan tempatnya dalam sistem taksonomi, apakah keputusan itu mutlak ? Tidak. Skema klasifikasi dalam mikrobiologi secara berkala dimodifikasi; penataan taksonomik yang terdahulu menghasilkan yang lebih baik karena didasarkan pada pengetahuan yang lebih baru. Contoh-contoh berikut ini menggambarkan sifat beberapa perubahan yang telah terjadi.

Tabel 4.2. Jumlah spesies beberapa bakteri berdasar tahun Edisi Bergey's Manual

EDISI BERGEY'S MANUAL KE		JUMLAH SPESIES PADA GENUS TERPILIH				
		<i>Bacillus</i>	<i>Actino myces</i>	<i>Pseudo monas</i>	<i>Echerichia</i>	<i>Srepto myces</i>
1	1923	75	64	20	22	0
2	1925	75	64	20	22	0
3	1930	93	70	31	29	0
4	1934	93	70	31	22	0
5	1939	34	62	31	2	0
6	1947	33	2	148	3	73
7	1957	25	3	149	4	149
8	1974	22	5	29	1	415

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, edisi ke-8 (1974) merupakan sumber informasi yang secara umum diterima bagi taksonomi bakteri. Masing-masing dari delapan edisi itu, diterbitkan sejak tahun 1923. memasukkan berbagai jumlah spesies untuk berbagai genus. Beberapa contoh, disajikan pada Tabel 4-2. menunjukkan adanya perubahan besar dengan berjalannya waktu dalam jumlah spesies yang dimasukkan ke dalam genera ini. Mengapa? Berbagai alasan dapat dikemukakan. Beberapa ahli mikrobiologi yang bekerja dalam bidang taksonomi disebut sebagai "pemecah": mereka menetapkan spesies-spesies baru berdasarkan perbedaan-perbedaan yang kecil saja di antara kelompok yang berkerabat. Mikrobiologi yang lain yang menekuni taksonomi dinamakan "pemer-satu"; mereka tidak menganggap perbedaan-perbedaan kecil itu cukup untuk mendirikan spesies-spesies yang baru.

Alasan lain untuk perubahan-perubahan ini berkaitan dengan terkumpulnya informasi baru mengenai mikroorganisme. Informasi baru itu dapat memberikan bukti yang lebih baik untuk memastikan spesies baru, meniadakan beberapa spesies, atau kedua-duanya. Alasan yang lain lagi, ialah meningkatnya perhatian terhadap sekelompok mikroorganisme tertentu. Lihat lagi Tabel 4-2 dan perhatikan apa yang terjadi pada genus *Streptomyces*. "Ledakan" spesies baru ini muncul karena penemuan dalam

tahun 1940-an yaitu spesies-spesies *Streptomyces*. menghasilkan antibiotik. Penemuan ini mengawali pencarian utama mikroorganisme ini di seluruh dunia dengan harapan menemukan penghasil antibiotik yang baru dan yang lebih baik.

Penyusutan jumlah spesies di dalam genus tampak pada *Escherichia* (Tabel 4-2). Empat edisi yang pertama *Bergey's Manual* mencatat lebih dari 20 spesies; edisi yang kedelapan hanya mencantumkan satu. Hal ini mencerminkan perubahan dalam penilaian ciri-ciri yang membenarkan dipecahnya suatu kelompok menjadi beberapa spesies.

4.7. RINGKASAN DAN PROSPEK

Klasifikasi mikroba mempunyai sejarah yang panjang dan selama itu telah diusulkan banyak sistem taksonomi. Suatu sistem taksonomi mikroba yang baik memang sangat penting untuk keteraturan ilmu pengetahuan mikrobiologi. Ilmu pengetahuan bukanlah semata-mata suatu koleksi rupa-rupa fakta; melainkan merupakan organisasi dan interpretasi fakta-fakta ini ke dalam suatu sistem yang menampilkan hubungan di antara berbagai kategori. Demikian pula dengan taksonomi mikroba. Suatu sistem taksonomi yang baik harus mengurangi kesimpangsiuran dan menciptakan keteraturan. Dari sudut yang sangat praktis, skema klasifikasi menyajikan suatu cara untuk mempelajari secara serentak ciri-ciri utama banyak spesies dengan cara mempelajari ciri genus masing-masing. Sebagai contoh, *Bergey's Manual* (1974) menggambarkan 48 spesies dalam genus *Bacillus* dan 61 spesies dalam genus *Clostridium*. Kedua genus tersebut tergolong ke dalam famili Bacillaceae. Bila anda mengetahui kriteria yang menjadi dasar takson ini, maka pada waktu yang bersamaan anda juga akan mengetahui beberapa dari ciri-ciri utama 109 spesies bakteri.

Taksonomi mikroba merupakan suatu bidang yang dinamis dan tidak statis. Mikroorganisme baru terus-menerus ditemukan dan tersedia pengetahuan baru mengenai mikroorganisme yang telah diklasifikasikan. Informasi baru yang paling dapat diharapkan yang sedang diusahakan menjadi tersedia datang dari analisis DNA sel mikroba. Informasi ini sangat penting dan berharga untuk menentukan keabsahan kelompok-kelompok takson. Di samping itu, penggunaan taksonomi numeris atau komputer yang semakin meningkat akan memberikan objektivitas yang lebih besar dalam pemantapan kelompok-kelompok taksonomi.

Bab 5

PREPARASI ANALISA SECARA KUALITATIF

Pokok Bahasan :

Prosedur analisa pembuatan bioethanol dari rumput gajah meliputi analisa selulosa, glukosa, ethanol dan analisa glukosa sisa. Untuk analisa selulosadan ethanol menggunakan spektrofotometer pharo, sedangkan untuk glukosa dan glukosa sisa menggunakan alat HPLC

Tujuan Instruksional , pembaca diharapkan :

1. Memahami pengertian tentang cara analisa selulosa
2. Memahami pengertian tentang cara analisa glukosa
3. Memahami pengertian tentang cara analisa ethanol
4. Memahami pengertian tentang cara analisa ethanol

5.1. Pendahuluan

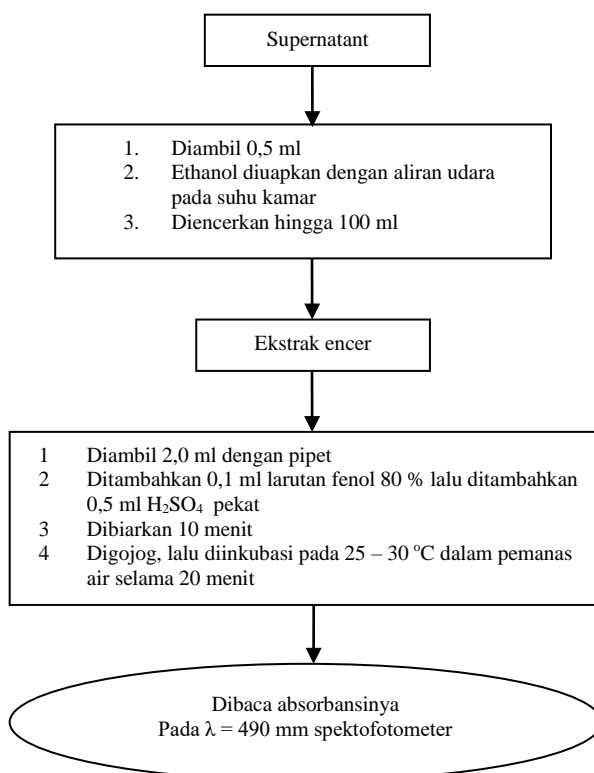
Prosedur analisa pembuatan bioethanol dari rumput gajah sangat diperlukan, meliputi analisa selulosa, glukosa, ethanol dan analisa glukosa sisa. Untuk analisa selulosa dan ethanol menggunakan spektrofotometer pharo, dalam pelaksanaan analisa digunakan kalibrasi langsung didalam alat tersebut. Sedangkan untuk glukosa dan glukosa sisa menggunakan alat HPLC, dalam pelaksanaan analisa digunakan kalibrasi tersendiri menggunakan kalibrasi linier.

5.2. Analisa Kadar Glukosa

Glukosa jika dipanaskan dengan asam mineral kuat seperti H_2SO_4 akan mengalami dehidrasi menjadi furfural dan derivatnya. Proses dehidrasi ini diikuti dengan kondensasi dari derivat furfural dengan fenol dan hal ini merupakan dasar analisis metoda HPLC.

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

Untuk perhitungan dibuat kurva standart dari larutan glukosa. Tata cara analisis gula total dilakukan seperti terlihat pada diagram.



Bahan – bahan kimia yang digunakan untuk analisa adalah :

- Fenol 80% dibuat dengan melarutkan 20 g fenol p.a. dengan 5 g air.
- H₂SO₄ pekat = H₂SO₄ 95.5%.
- Larutan glukosa 100 g ditimbang 0,01 g glukosa anhidrat ditambah 0,1 g Na benzoat, diencerkan hingga 100 ml dengan H₂O.

5.3. Analisa Kadar Ethanol

- Hasil fermentasi diambil sebanyak 100 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu distilasi dan ditambah 50 cc aquadest.
- Lalu didistilasi dan hasil distilasi ditampung dengan erlenmeyer

- Hasil distilasi tersebut dimasukkan ke dalam piknometer dan ukurlah berat jenisnya.

Perhitungan :

- Timbang piknometer kosong : a gram
- Timbang piknometer yang berisi hasil distilat : b gram
- volume piknometer : v ml

Maka : berat jenis (ρ) =
$$\frac{b - a}{v}$$

Dari hasil berat jenis tersebut, kemudian dilihat kadar ethanol pada tabel 3.110 Perry 6 ed.

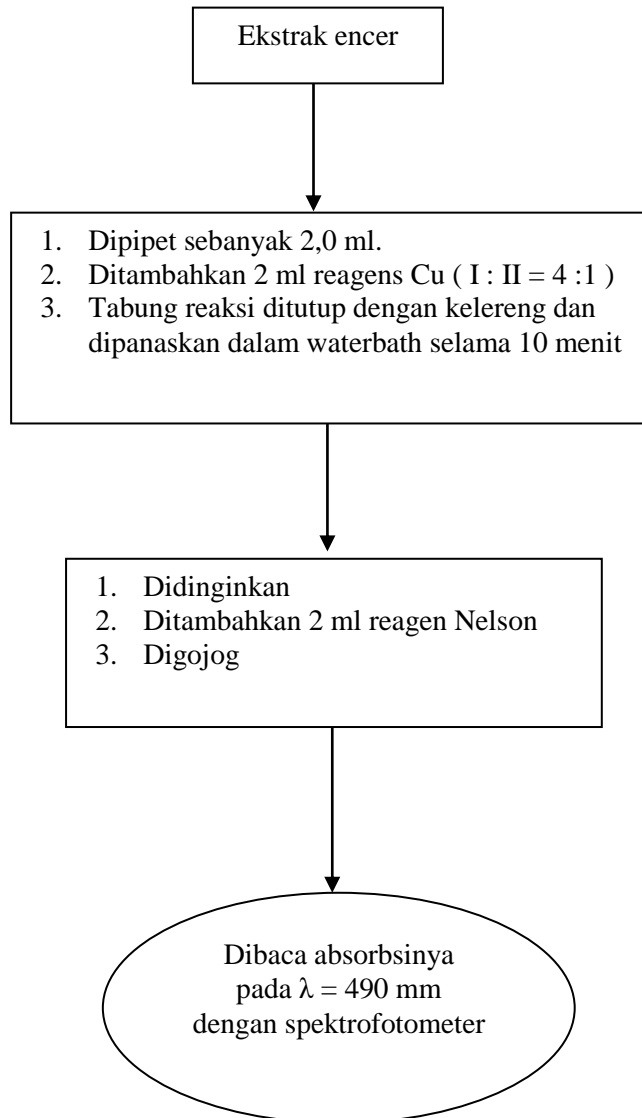
5.4. Analisa Kadar Glukosa Sisa

Bahan – bahan kimia yang perlu disiapkan adalah :

- Larutan I : larutan 12 g garam Rochells (KNa-tartarat) 24 g Na_2CO_3 anhidrat, 16 g NaHCO_3 dan 144 g Na_2SO_4 anhidrat dalam air hingga volumenya 800 ml.
- Larutan II : larutan 4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 36 g Na_2SO_4 dalam air, hingga volumenya 200 ml.
- Reagen Nelson : larutan 25 g ammonium molibdat $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dalam air sebanyak 450 ml. Tambahkan H_2SO_4 pekat sebanyak 21 ml. Selanjutnya larutan 3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sodium arsenat heptahidrat) dalam air 25 ml. Kedua larutan itu berwarna coklat. Simpanlah pada 37°C untuk 1 – 2 hari. Jika perlu, saringlah sebelum dipakai larutan yang baik adalah yang berwarna kuning tanpa sebagian berwarna hijau.

Gula Sisa dapat mereduksi ion kupri menjadi kupro-oksida, dalam hal ini mereduksi reagen Nelson (Arsenomolibdat) menghasilkan warna biru.

Hal ini digambarkan pada bagan sebagai berikut :





Penggojogan



Penyaringan dengan membrane

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...



Analisa dengan HPLC

Bab 6

ANALISA KUANTITATIF DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Pokok Bahasan :

Dalam bab ini dibahas tentang alat HPLC kromatografi kolom karena dipakai fase diam yang diisikan atau terpacking didalam kolom. Tetapi bila ditinjau dari pemisahannya, HPLC termasuk kromatografi adsorpsi atau kromatografi partisi atau asas lainnya tergantung jenis kolom yang dipakai dan analit yang ditentukan. Jadi tergantung pada butiran-butiran fasa diam yang ada didalam kolom apakah sebagai fasa padat murni atau disebut cairan.

Teori dasar tentang HPLC, meliputi : Profil Kromatogram, Waktu Tambat, Faktor Kapasitas, Jumlah Plat Teori, Jarak Setara Pelat Teori, Persamaan *Van Deemter*, Resolusi, Faktor Simetri, Gerbang Suntik, Kolom HPLC. Dalam pelaksanaan analisis dengan HPLC perlu diperhatikan tentang hal-hal sebagai berikut: Pemilihan Pelarut Pengembang HPLC, Pemilihan Kolom, Penggunaan Kolom, Penyiapan Sampel, Metode Analisis HPLC, Gangguan pada HPLC dan cara Penanganannya.

Tujuan Instruksional , pembaca diharapkan :

1. Memahami pengertian tentang alat HPLC.
2. Memahami pengertian tentang teori HPLC
3. Memahami pengertian tentang pelaksanaan analisis dengan HPLC
4. Mampu menjalankan prosedur kerja HPLC.
5. Memahami contoh analisa HPLC.

6.1. PENDAHULUAN

HPLC singkatan dari "High Performance Liquid Chromato-graphy" atau "High Pressure Liquid Chromatography", kadang-kadang HPLC diistilahkan LC (Liquid Chromatography) atau di Indonesia diistilahkan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi).

Dari sistem peralatannya, HPLC termasuk kromatografi kolom karena dipakai fase diam yang diisikan atau terpacking didalam kolom. Tetapi bila ditinjau dari pemisahannya, HPLC termasuk kromatografi adsorpsi atau kromatografi partisi atau asas lainnya tergantung jenis kolom yang dipakai dan analit yang ditentukan. Jadi tergantung pada butiran-butiran fasa diam yang ada didalam kolom apakah sebagai fasa padat murni atau disebut cairan.

Perkembangan HPLC berawal dari proses pemisahan yang berazaskan absorpsi dari partisi ke arah yang lebih luas yaitu proses pemisahan yang berazaskan afinitas, filtrasi gel dan ion yang berpasangan, akan tetapi proses pemisahannya tetap dilaksanakan didalam kolom disertai pemakaian pelarut pengembang dengan tekanan tinggi.

Maksud dan tujuan analisis dengan HPLC hanya ada dua hal yaitu : didaptkannya pemisahan yang baik dan proses analisis berlangsung dalam waktu relatif singkat. Untuk tercapainya maksud dan tujuan tersebut, maka diperlukan penataan yang betul-betul sudah dipersiapkan dan diperhitungkan antara lain:

- Dipilih pelarut pengembang atau pengembang campuran yang sesuai untuk komponen yang dipisahkan.
- Berkaitan dengan pemilihan pelarut pengembang fasa mobil maka kolom yang dipakai juga harus diperhatikan.
- Detektor yang memadai
- Pengetahuan dasar HPLC yang baik serta pengalaman dan keterampilan kerja yang baik.

Kalau analisa dengan HPLC dapat dilaksanakan dengan baik, maka dapat dikatakan derajatnya sama dengan GLC (Kromatografi Gas Cair) yang memakai kolom kapiler.

HPLC memiliki beberapa keuntungan seperti :

- Dapat dilakukan pada suhu kamar.
- Kolom dan pelarut pengembang dapat digunakan berkali-kali
- Detector HPLC dapat divariasi dan banyak jenisnya
- Waktu analisis pada umumnya singkat
- Ketepatan dan ketelitiannya yang relatif tinggi
- Mudah dioperasikan secara otomatis

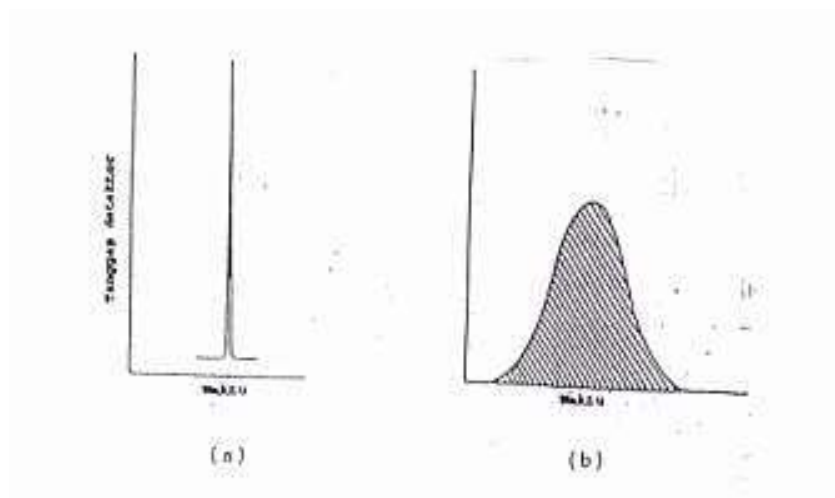
Ruang lingkup Penggunaan HPLC sering tumpang tindih dengan penggunaan Kromatografi Gas. Secara umum, biaya yang digunakan untuk keperluan HPLC lebih besar dari pada kromatografi gas, sehingga seolah-olah kromatografi gas akan lebih banyak dari pada HPLC. Biaya tersebut meliputi alat instrumentasi HPLC, kolom dan fasa geraknya, Namun masih banyak senyawa organik yang tidak stabil atau tidak dapat menguap bila dianalisa dengan kromatografi gas tanpa suatu modifikasi kimiawi sehingga HPLC merupakan pilihan pertama untuk senyawa organik yang tidak stabil atau tidak menguap seperti bahan-bahan farmasi, makanan/minuman, biokimia, kosmetik, serta bahan yang berhubungan dengan lingkungan akan lebih sesuai dipisahkan menggunakan HPLC.

6.2. TEORI DASAR HPLC

1. Profil Kromatogram

Idealnya profil setiap kromatogram HPLC merupakan suatu garis tegak lurus bagi masing-masing analit (Gambar 6.1.a). Namun keadaan demikian tidak akan dijumpai pada pelaksanaan analisis dengan HPLC. Kromatogram HPLC merupakan hubungan antara waktu sebagai absis dan tanggap detektor sebagai ordinat pada sistem koordinat cartesian, dimana titik nol dinyatakan sebagai saat dimulainya injeksi sample. Molekul-molekul sampel yang diinjeksikan menuju kolom analisis tidak akan berkumpul pada satu titik secara serempak dalam waktu yang sama. Demikian pula tiap-tiap molekul analit akan mengalami hambatan fasa diam didalam kolom dengan waktu yang berbeda. Oleh karena itu semua molekul analit tidak serempak keluar dari kolom. Molekul analit akan keluar dari kolom tersebut secara cak dan demikian pula untuk respon detector terhadap analit keluar dari kolom tidak serempak terhadap semua molekul. Sebagai akibat kenyataan tersebut, maka profil kromatogram akan melebar secara ideal membentuk kurva Gauss (Gambar 6.1.b)

Parameter-parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui kualitas suatu kromatogram, yaitu : waktu tambat, faktor kapasitas, jarak setara plat teori, resolusi dan faktor simetri.



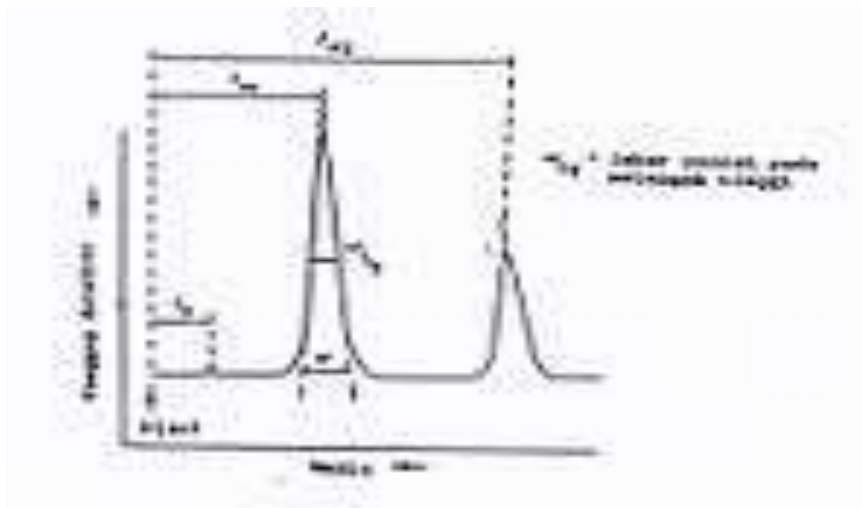
Gambar 6.1. Profil kromatogram HPLC

Setelah mengetahui profil kromatogram dari pemisahan suatu analit, maka harus dapat diketahui kualitas pemisahannya yaitu faktor-faktor apa saja yang dapat mempengaruhi kualitas pemisahan dan variabel analitik yang digunakan untuk memperbaiki kualitas tersebut. Oleh karena itu diperlukan suatu ukuran yang analit tersebut telah terpisah satu sama lain secara sempurna.

Dalam bab ini akan dibahas mengenai parameter-parameter yang dapat dipergunakan untuk mengetahui kualitas suatu kromatogram, yaitu: waktuambat, jarak setara pelat teori, faktor kapasitas dan resolusi.

2. Waktu Tambat

Pada Gambar 6.2. terdapat tiga macam puncak, dua buah puncak yang berukuran besar adalah puncak-puncak yang dihasilkan oleh analit yang tertahan pada fasa diamnya pada sistem kesetimbangan distribusi yang tegas (dinamis). Di samping itu terdapat puncak kecil yang dihasilkan oleh analit yang tidak tertahan oleh fasa diam, namun bersama fasa gerak keluar dari kolom dengan kecepatan yang sama dengan kecepatan fasa geraknya.



Gambar 6.2. Perhitungan waktu tambat kromatogram

Selang waktu yang diperlukan oleh analit mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya secara maksimal ditangkap oleh detektor disebut sebagai waktu tambat atau waktu retensi (retention time). Waktu tambat analit yang tertahan pada fase diam dinyatakan sebagai t_R . Sedangkan waktu tambat analit yang tidak tertahan pada fase diam atau sering disebut sebagai waktu tambat pelarut pengembang dinyatakan t_0 atau t_M . Harga t_0 akan lebih kecil dari harga t_R , karena yang akan mencapai ujung kolom lebih dahulu adalah pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur. Waktu tambat analit dikurangi dengan waktu tambat pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur disebut waktu tambat terkoreksi (t_R'), yang dinyatakan sebagai t_R' .

$$t_R' = t_R - t_M \quad \text{..... (6.1)}$$

Waktu tambat yang dinyatakan dalam satuan waktu (menit) memberi arti yang sangat penting dalam analisis kualitatif dengan HPLC.

Berikut ini akan dibahas hubungan antara t_R' , t_M , dan K_d , telah diketahui bahwa :

$$K_d = C_s / C_m$$

Dimana C_s dan C_m masing-masing sebagai konsentrasi analit dalam fase diam dan fase bergerak. Kalau harga K_d kecil, maka analit akan lebih banyak di dalam fasa gerak ($C_m > C_s$) yang berarti analit akan lebih lama tinggal didalam fasa gerak.

Kesetimbangan analit didalam fasa gerak dan fasa diam merupakan suatu kesetimbangan yang dinamis, artinya fraksi waktu analit berada dalam fasa gerak setara terhadap fraksi jumlah analit yang berada di dalam fasa gerak, pernyataan tersebut dapat dinyatakan sebagai berikut :

$$t_{(dalam\ waktu\ tertentu)} = \frac{jumlah\ linarut\ dalam\ fasa\ gerak}{jumlah\ linarut\ total}$$

$$t = \frac{C_m \times V_m}{C_m \times V_m + C_s \times V_s} \dots\dots\dots (6.2)$$

Dimana V_m dan V_c adalah volume fasa gerak dan volume fasa diam. Kalau jarak tempuh analit adalah d dan kecepatan fasa gerak adalah μ , maka : $d = \mu.t$

Jika panjang kolom adalah L , maka :

Dalam hal ini $t_M = L/\mu$,

$$t_R = t_M (1 + Kd \frac{V_s}{V_m}) \dots\dots\dots (6.3)$$

Dari persamaan yang terakhir bahwa harga t_M , V_s , V_m dapat diatur. Dengan demikian harga t_R akan menjadi spesifik untuk tiap-tiap analit. Campuran zat yang diinjeksikan untuk dianalisis dengan HPLC tentu mempunyai harga t_R yang berbeda karena tiap-tiap analit mempunyai K_d yang spesifik.

3. Faktor Kapasitas

Faktor kapasitas (k') merupakan ciri khas suatu analit pada kondisi tertentu, yaitu pada komposisi fasa gerak, suhu dan jenis kolom (panjang kolom, diameter kolom dan ketebalan lapisan film) tertentu. Meskipun suatu puncak kromatogram dapat diidentifikasi melalui waktuambatnya, namun akan lebih baik bila diidentifikasi dengan menggunakan faktor

kapasitas karena harga waktu tambat dapat berubah-ubah sesuai dengan panjang kolom dan kecepatan alir fasa gerakanya.

Faktor kapasitas dapat memberikan gambaran dimana puncak-puncak analit terelusi secara relatif terhadap puncak fasa gerakanya, faktor kapasitas (k') dinyatakan sebagai berikut :

$$k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \dots\dots\dots (6.4)$$

$(t_R - t_0)$ adalah waktu tambat terkoreksi dan t_0 adalah waktu tambat fase gerak, harga faktor kapasitas (k') yang baik berkisar antara 1 dan 10. Bila harga k' kecil berarti puncak-puncak analit belum saling berhimpitan (overlapping) dengan puncak fasa gerakanya. Sedangkan harga k' yang besar menunjukkan bahwa waktu pemisahan yang dilakukan terlalu lama. Faktor kapasitas hanya menjamin pemisahan dua puncak kromatogram pada bagian atasnya saja.

4. Jumlah Plat Teori

Jumlah plat teori (N) adalah banyaknya distribusi keseimbangan dinamis yang terjadi didalam suatu kolom, digunakan untuk mengetahui efisiensi suatu kolom kromatografi, dimana harga N diperoleh melalui persamaan berikut :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \dots\dots\dots (6.5)$$

Dimana :

t_R = waktu tambat analit

W = lebar pada dasar puncak

$W_{1/2}$ = lebar pada setengah tinggi puncak

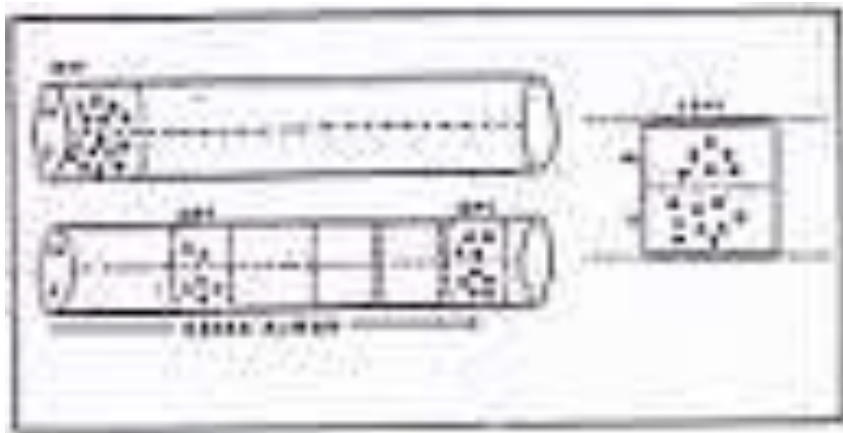
Dalam proses pemisahan diharapkan untuk menghasilkan harga N yang sebesar-besarnya. Pada umumnya efisiensi kolom HPLC meningkat dengan semakin kecilnya ukuran partikel yang ada didalam kolom. Kolom fasa terbalik (RP) yang menggunakan silika mempunyai 50000 pelat/meter

bila dikemas dengan menggunakan partikel yang berukuran 5 μm . Jika dikemas dengan partikel yang berukuran 10 μm akan dihasilkan 25000 pelat/meter. Berapakah jumlah pelat yang dihasilkan oleh kolom fasa terbalik (RP) yang mempunyai panjang 12,5 cm dan dikemas dengan partikel yang berukuran 5 μm ?

$$N = \frac{50000}{100/12,5} = 6250$$

5. Jarak Setara Pelat Teori (JSPT)

JSPT disebut juga TSPT (Tinggi Setara Plat Teori), secara internasional dikenal HETP (*High Equivalent of Theoretical Plate*) atau disingkat huruf H saja. JSPT adalah panjang kolom kromatografi (mm) yang diperlukan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan distribusi dinamis molekul analit dalam fase gerak dan fase diam. Gambar 6.3. adalah ilustrasi yang memudahkan untuk memahami tentang JSPT dalam kromatografi.



Gambar 6.3. Ilustrasi tentang JSPT dalam kolom

Panjang kolom dirumuskan sebagai berikut :

$$H = L / n, \quad \text{atau} \quad H = L / N$$

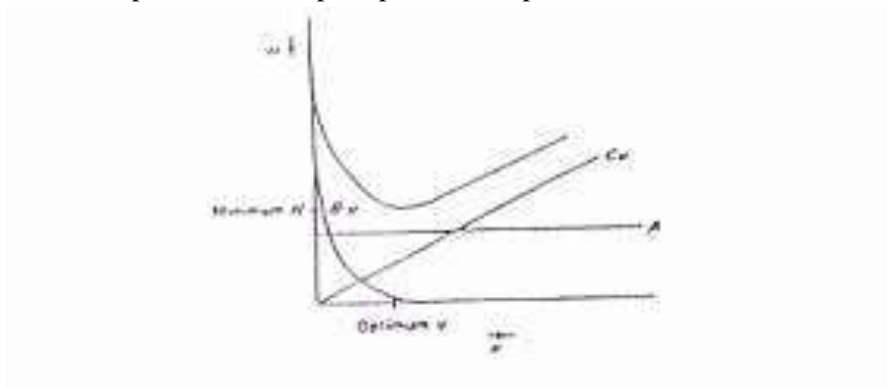
Ada beberapa ilmuwan yang menghubungkan haega H sebagai pengukur efisiensi kolom yaitu sebagai berikut

$$1/H = N/L \dots\dots\dots (6.6)$$

N/L adalah bilangan yang menunjukkan jumlah pelat teori efektif persatuan panjang kolom, misalnya 3000 pelat/meter untuk harga $H = 0,33$ mm. Makin besar harga N/L atau makin kecil harga H maka makin efisien kolom yang dipakai untuk pemisahan. Disamping panjang kolom ada dua parameter lainnya yang juga mempengaruhi efisiensi kolom.

6. Persamaan Van Deemter

Van Deemter mengemukakan suatu persamaan antara JSPT terhadap laju aliran fase gerak (μ), persamaan Van Deemter ini berlaku juga untuk Kromatografi gas. Hubungan antara JSPT (H) terhadap laju alir fase gerak (μ) digambarkan oleh Van Deemter sebagai grafik yang mendekati parabola atau elips, seperti terlihat pada Gambar 11.4.



Gambar 6.4. Kurva persamaan Van Deemter

Pada kurva akan didapat laju alir fase gerak yang optimal dan harga JSPT yang minimal, secara umum persamaan Van Deemter sebagai berikut:

$$H = A + B / \mu + C \cdot \mu \dots\dots\dots (6.7)$$

dimana :

A = difusi pusaran (*Eddy diffusion*)

B = difusi molekul fase gerak

C = tahanan alih massa

μ = kecepatan alir fase gerak

- **Difusi Pusaran (*Eddy Diffusion*)**

Difusi pusaran adalah suatu istilah untuk menggambarkan adanya perbedaan jalur aliran yang dilalui oleh molekul-molekul analit yang terjadi didalam kolom. Perbedaan jalur aliran ini terjadi karena partikel fasa diam mempunyai ukuran dan bentuk yang berbeda-beda. Selain itu juga disebabkan oleh pengemasan kolom yang tidak sempurna sehingga menimbulkan ruang kosong didalam kolom. Molekul-molekul analit akan menempuh jarak yang berbeda dalam waktu tertentu meskipun molekul-molekul tersebut melaju dengan kecepatan yang sama.



Gambar 6.5. Mekanisme difusi pusaran

Untuk mengurangi pengaruh difusi pusaran ini dapat dilakukan dengan jalan mengurangi perbedaan jalur aliran yang dilalui molekul analit dengan cara mengemas kolom dengan ukuran partikel seragam.

- **Tahanan Alih Massa**

Efek ini timbul karena adanya molekul analit yang berinteraksi dengan molekul fasa diamnya. Molekul-molekul analit ini akan terikat terlebih dahulu pada molekul fasa diam selama beberapa saat sebelum berada di dalam fasa gerak untuk keluar dari kolom. Molekul analit yang berinteraksi ini akan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk keluar dari kolom apabila dibandingkan dengan molekul analit yang tidak berinteraksi dengan fasa diam.



Gambar 6.6. Mekanisme tahanan alih massa

Efek tahanan alih massa ini dapat dikurangi dengan menggunakan ukuran partikel yang kecil atau partikel yang mempunyai ukuran pori yang kecil. Disamping itu dapat juga digunakan fasa gerak yang mempunyai viskositas yang rendah.

- **Difusi Molekul Fasa Gerak**

Efek ini timbul karena adanya molekul analit yang berada dalam fasa gerak mengalami difusi ke dalam kolom. Difusi ini akan terjadi lebih lama apabila molekul analit tersebut berada didalam kolom dalam jangka waktu yang lama. Oleh karena itu untuk mengurangi pengaruh difusi ini diperlukan peningkatan kecepatan aliran fasa geraknya.



Gambar 6.7. Mekanisme difusi molekul fasa gerak kedalam kolom

Fasa gerak (G) akan menurun apabila kecepatan fasa gerak ditingkatkan, sedangkan difusi pusaran (A) dan tahanan alih massa (C) memerlukan kecepatan alir yang rendah untuk mengurangi timbulnya efek tersebut. Oleh karena itu Van Deemter membuat suatu kurva yang merupakan penjumlahan dari ketiga kurva yang telah ada. Hal ini dimaksudkan untuk mendapatkan kecepatan aliran fase gerak (μ) yang optimal dan JSPT (H) yang minimal.

Untuk mendapatkan harga H_{\min} dan μ_{opt} , maka ada beberapa hal yang perlu diperhatikan selama pelaksanaan HPLC, yaitu:

1. Suhu kolom diatur supaya tidak berubah
2. Efek difusi diusahakan sekecil mungkin
3. Laju aliran fasa gerak harus konstan
4. Tidak ada faktor lain yang mengganggu keseimbangan adsorpsi

7. Resolusi

Apabila dilakukan campuran dua analit dengan metode HPLC maka akan didapat dua puncak yang mempunyai waktu tambat yang berbeda. Sedangkan tujuan utama dari analisis dengan metoda HPLC adalah didapakkannya pemisahan yang lebih baik. Oleh karena itu diperlukan parameter yang dapat menggambarkan pemisahan kroma-togram analit tersebut. Parameter yang diperlukan tersebut adalah: resolusi (R_s) dan faktor pemisahan atau faktor selektivitas yang dinyatakan sebagai α . Faktor pemisahan (α) menggambarkan pemisahan antara dua puncak relatif terhadap satu sama lain, dan dinyatakan dengan persamaan berikut:

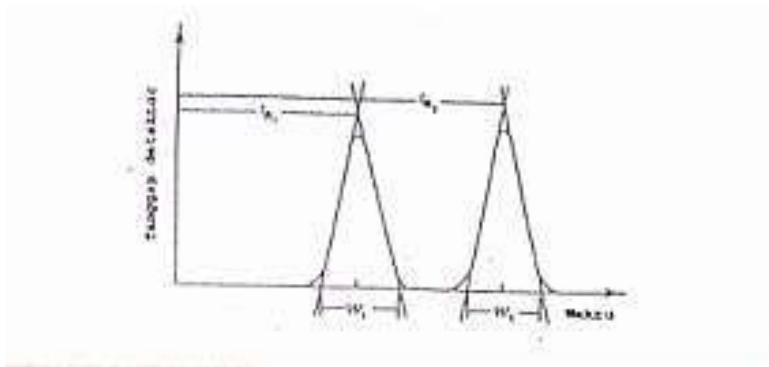
$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_o}{t_{R1} - t_o} \dots\dots\dots (6.8)$$

Dimana α harus > 1 .

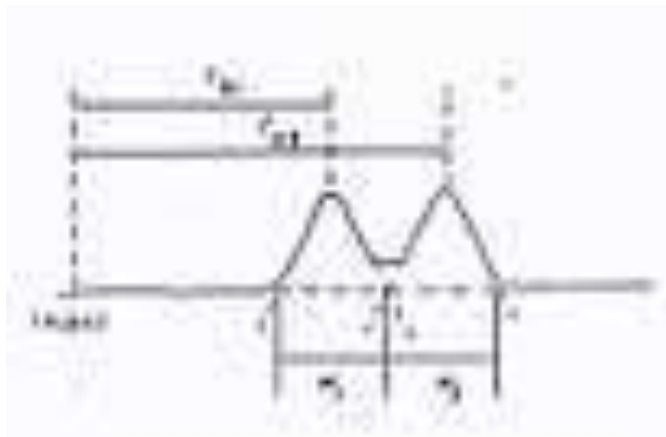
Resolusi (R_s) mengukur perbedaan waktu tambat (t_R) dari duamacam analit yang dibagi dengan lebar dasar puncaknya (w).

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5(w_1 + w_2)} \dots\dots\dots (6.9)$$

Jadi dapat dikatakan bahwa faktor pemisahan (α) hampir sama dengan resolusi (R_s), yang membedakan antara keduanya adalah pada resolusi melibatkan waktu tambat dan lebar dasar puncak, sedangkan faktor pemisahan hanya melibatkan waktu tambat saja (pemisahan bagian atas dari kromatogram).



Gambar 6.8. Pemisahan dua analit



Gambar 6.9. Dua puncak yang tidak terpisah

Apabila dua puncak tidak dapat terpisah dengan sejati, maka penentuan lebar dari puncak dapat dilihat pada Gambar 6.9.

Untuk mencapai resolusi yang optimal diperlukan persamaan sebagai berikut:

$$R_s = 0,25 \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{\bar{k}}{1 + \bar{k}} \right) N^{1/2} \quad \dots\dots\dots (6.10)$$

α = faktor pemisahan

k = rata-rata faktor kapasitas dari dua puncak

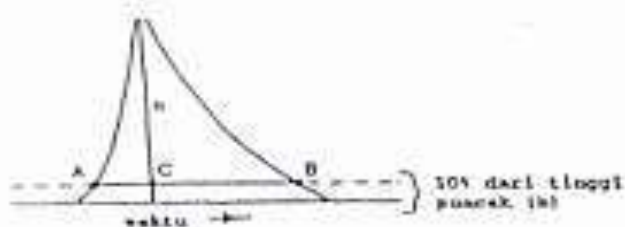
N = rata-rata jumlah pelat

Harga resolusi sangat bervariasi dari dua analit yang mempunyai harga $R_s = 1-1,5$ dapat dikatakan dua kromatogram dari dua puncak tersebut terpisah 98 – 99,7 %. Apabila dua puncak menghasilkan harga resolusi yang kecil atau bahkan <1 , maka dua puncak tersebut saling berhimpitan (overlapping)

8. Faktor Simetri

Faktor simetri disebut juga *tailing factor* (TF) yaitu terjadinya pengekoran pada kromatogram sehingga bentuk kromatogram menjadi tidak simetris. Gambar dibawah ini menunjukkan bagaimana mengukur besarnya TF dinyatakan dengan angka nisbah :

$$TF = BC / AC = b/a$$



Gambar 6.10. Mengukur besarnya TF pada kromatogram

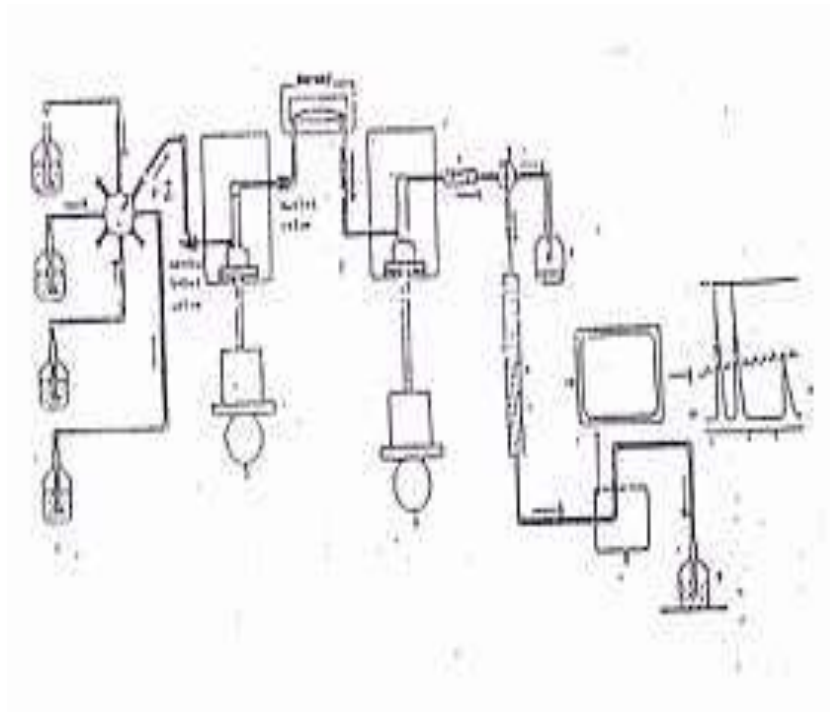
Untuk kromatogram yang memberikan harga $TF = 1$ berarti kromatogram tersebut betul-betul simetris. Harga $TF > 1$ berarti kromatogram tersebut mengekor (tailing), makin besar harga TF maka makin efisien kolom yang dipakai. Bila harga $TF < 1$ berarti kromatogram tersebut mengandung (fronting), dan dapat diatasi dengan mengurangi volume injeksi awal. Jadi harga TF dapat digunakan sebagai pedoman untuk melihat efisiensi kolom kromatografi. Hubungan efisiensi kolom dengan yang dicerminkan oleh harga N dengan TF atau AF (Asymetrical) dirumuskan oleh Foley dan Dorsey sebagai berikut:

$$N = \frac{41,7(t'_T / W_{0,1})}{(a + b) + 1,25} \dots\dots\dots (6.11)$$

Harga $W_{0,1}$ adalah berat lebar celah kromatogram pada posisi 10 % dari dasar kromatogram tinggi puncak. Salah satu penyebab terjadinya pengekoran kromatogram adalah ketidakcocokan sampel dengan jenis yang dipakai.

6.3. Instrumentasi HPLC

Secara garis besar instrumentasi serta urutan letak HPLC tampak seperti pada gambar berikut:



Gambar 6.11. Susunan perangkat HPLC

Keterangan gambar :

1. Botol-botol eluen
2. Pompa tekanan rendah
3. Pompa tekanan tinggi
4. Kolom pelindung
5. Gerbang suntik
6. Kolom analitik
7. Pembuangan

8. Detector
9. Penampung eluen
10. Integrator
11. Kromatogram

Selanjutnya pada bab ini secara terinci akan dibahas masing-masing unit peralatan HPLC yang memegang peranan penting.

1. Gerbang Suntik

Injeksi sampel untuk dianalisis dengan metoda HPLC merupakan tahap yang penting, karena meskipun kolom telah memadai, hasil kromatogram yang ditampilkan tidak akan memadai kalau injeksi sampel tidak dilakukan dengan tepat. Keadaan ini akan menjadi suatu keharusan apabila yang dituju analisis kuantitatif dengan HPLC. Oleh sebab itu perlu diketahui berbagai sistem injektor HPLC yang umum dipakai.

Ada tiga macam sistem injektor pada HPLC yaitu:

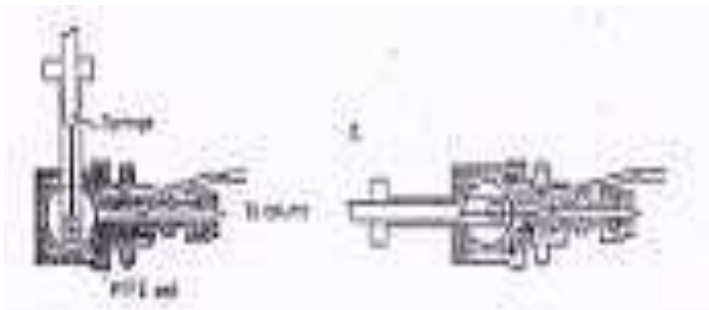
1. Injektor dengan memakai diafragma (*Septum injector*)
2. Injektor tanpa memakai diafragma (*Septumless injection system*)
3. Injektor dengan pipa dosis (*Loop valve*)
4. Sistem injeksi otomatis (*Autoinjector*)



Gambar 6.12. Sistem injeksi dengan diafragma (septum)

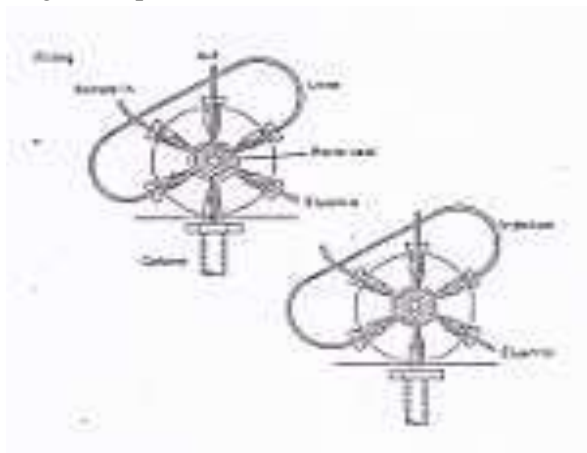
Keuntungan menggunakan injektor memakai diafragma adalah:

1. Pengambilan volume sampel yang akan diinjeksikan dapat dipilih sesuai dengan keinginan
2. Sederhana dan harganya murah
3. Dapat diinjeksi dengan volume sampel yang sedikit
4. Merupakan sistem injeksi yang paling banyak digunakan



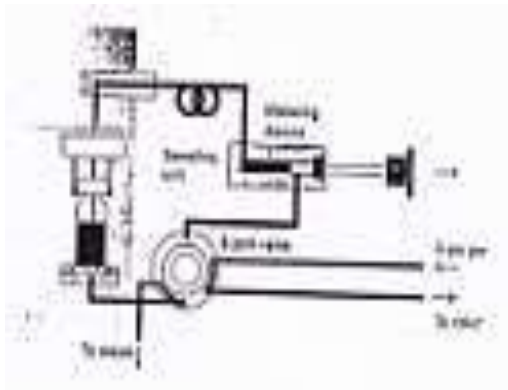
Gambar 6.13. Sistem injeksi dengan diafragma (septum)

Keuntungan menggunakan sistem injeksi tanpa diafragma (*Septumless injection system*) adalah dapat mencegah tersumbatnya jarum injektor karena pengaruh dari partikel diafragma(septum) dimana hal ini akan dapat menyumbat kolom HPLC. Sistem injeksi dengan menggunakan pipa dosis pada saat ini merupakan pilihan yang sangat tepat pada HPLC, khususnya untuk analisis kuantitatif. Sebab ketetapan jumlah volume sampel yang diinjeksi akan sangat penting untuk analisis kuantitatif dan keadaan ini hanya bisa didapatkan dengan injektor sistem pipa dosis (loop valve). Prinsip kerja pipa dosis adalah "*Load Inject*", dimana pada saat awal, sampel akan masuk memenuhi volume loop terlebih dahulu dan akhirnya segera masuk menuju kolom pemisahan dengan volume yang tidak berkurang sedikitpun.



Gambar 6.14. Pipa dosis

Pada Gambar 6.14 diatas terdapat 6 buah klep pengatur pada 6 posisi. Pada saat sampel diinjeksikan maka sampel tidak langsung masuk kedalam kolom, tetapi akan memenuhi pipa dosis (*loop valve*) terlebih dahulu. Pipa dosis ini mempunyai ukuran volume yang bermacam-macam dari $5\mu\text{L}$ – $2000\mu\text{L}$. Volume sampel yang diinjeksikan sebaiknya lima kali dari volume pipa dosisnya. Bila pipa dosisnya berukuran $20\mu\text{L}$ maka volume sampel yang diinjeksikan adalah $100\mu\text{L}$. Kelebihan sampel yang mengisi loop akan dikeluarkan ke penampung. Pada saat posisi inject maka rotor penggerak akan berputar sehingga injektor tidak lagi berhubungan dengan pipa dosis. Namun, pipa dosis yang terisi penuh oleh sampel yang berhubungan dengan kolom sehingga sampel akan menuju kolom dengan bantuan fase gerak.



Gambar 6.15. Sistem injeksi otomatis (autoinjector)

Autoinjektor mempunyai cara kerja yang hampir sama dengan cara kerja sistem injeksi dengan menggunakan pipa dosis atau sistem injeksi tanpa diafragma. Keuntungan sistem ini adalah volume yang diinjeksikan tidak akan berkurang selama proses injeksi dan mampu memisahkan sampel-sampel dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang singkat.

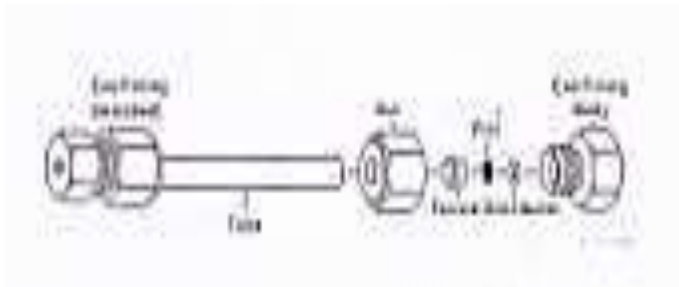
2. Kolom HPLC

Kolom pada HPLC merupakan bagian yang sangat penting, sebab pemisahan komponen-komponen sampel yang akan terjadi didalam kolomn. Oleh karena itu ada beberapa hal yang harus diperhatikan, yaitu

- Pemilihan kolom yang sesuai
- Pemeliharaan kolom

- Uji terhadap spesifikasi kolom (walaupun kolom tersebut merupakan kolom yang siap dipakai).

Kolom HPLC yang merupakan kunci penentu keberhasilan pemisahan komponen-komponen sampel serta hasil akhir analisis dibuat dalam bentuk lurus (tidak dibuat melingkar sebagaimana kolom pada kromatografi gas maupun bentuk U). Hal ini dimaksudkan untuk efisiensi kolom, sehingga mendapatkan harga H minimal.



Gambar 6.16. Penampang kolom konvensional

Ditinjau dari ukurannya (panjang dan diameternya) kolom HPLC dibagi atas sebagaimana terlihat pada Tabel 11.1

Tabel 6.1. Macam-macam kolom HPLC

Jenis kolom	Panjang (cm)	Diameter (mm)	dp (μm)
Konvensional	10 -20	4,5	10
Microbore	10	2,4	5
High Speed	6	4,6	3

Keterangan:

dp = diameter rata-rata fasa diam

Keuntungan :

Kolom dibuat dengan diameter internal sangat kecil (kolom mikro) dengan tujuan agar:

- Kepekaan menjadi lebih teliti
- Menghambat larutan pengembang
- Memperluas kemampuan detektor
- Sampel yang dianalisis sedikit

Kolom dibuat pendek (high speed) agar:

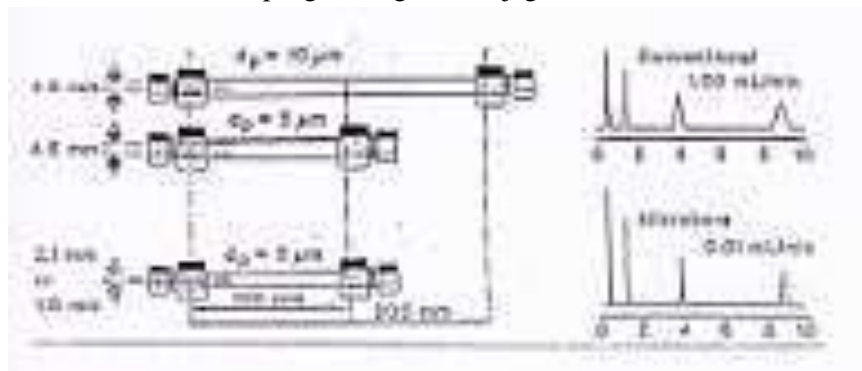
- Menghasilkan resolusi yang baik

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

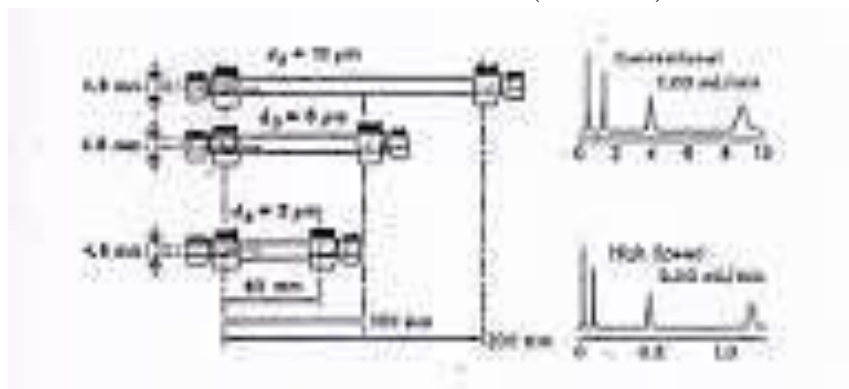
- Memperkecil harga diameter rata-rata partikel fasa diam
- Waktu t_R , T_M singkat (mengurangi pengaruh dari bagian instrumentasi HPLC terhadap hasil pemisahan)

Kerugian :

Kolom mikro / high speed dengan $d_p = 5$ dan $d_p = 3$ harus diperhatikan lebih teliti dibandingkan dengan kolom konvensional $d_p = 10$, sebab sela-sela partikel lebih mudah tertutup oleh kotoran. Jadi harus seringkali dicuci dan kemurnian larutan pengembang harus dijaga.



Gambar 6.17. Kolom mikro (microbore)



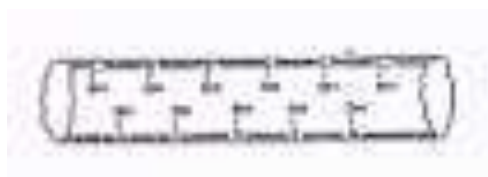
Gambar 6.18. Kolom high speed

- **Fasa Diam Kolom**

Dilihat dari jenis fasa diam dan fasa geraknya, maka kolom HPLC dibedakan atas :

Kolom Fasa Normal

Kromatografi dengan kolom konvensional mempunyai fasa diam normal yang bersifat polar, misalnya silika gel. Sedangkan fasa geraknya bersifat non polar, sehingga analit yang akan dipisahkan adalah analit yang bersifat non polar.

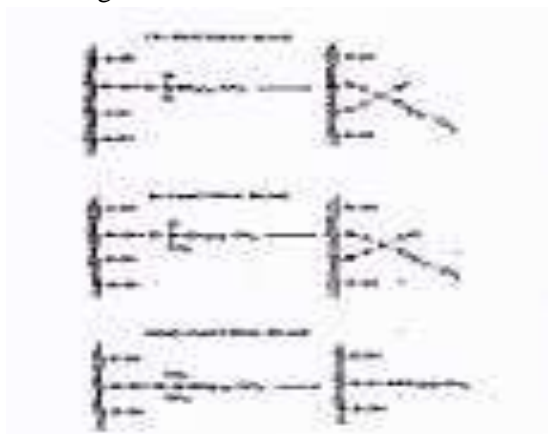


Gambar 6.19. Kolom fasa normal

Kolom Fasa Terbalik (Reversed Phase Column)

Kolom fasa terbalik adalah kolom yang fasa diamnya bersifat non polar, sedangkan fasa geraknya bersifat polar, kebalikan dari fasa normal. Kromatografi fasa terbalik sebenarnya sudah lama dipikirkan oleh Boscott (1947), tetapi baru pada tahun 1948 melalui suatu kolom yang berisi bahan karet (non polar) dan dielusi dengan bahan pengembang campur yang polar yaitu campuran air-metanol-aseton.

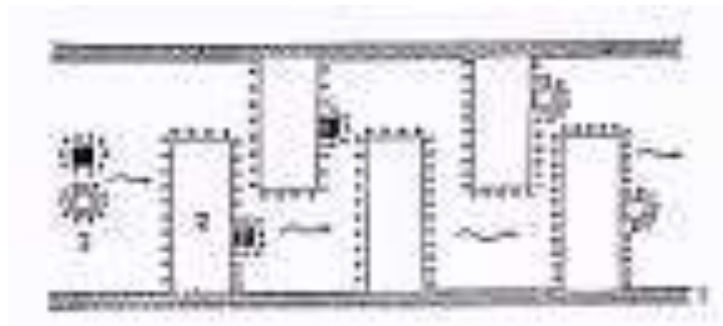
Untuk mendapatkan fasa yang non polar silika gel direaksikan dengan klorosilan Cl-Si(R)_n . Fasa diam yang non polar yang banyak dipakai adalah jenis C18, C8 dan C2. Reaksi terbentuknya fasa diam non polar (terbalik) adalah sebagai berikut:



Gambar 6.20. Reaksi preparasi kolom fasa terbalik

- **Sikat Molekuler**

Kolom kromatografi fasa terbalik dapat dimisalkan sebagai sikat molekuler dimana rantai-rantai hidrocarbon merupakan bulu-bulu dari sikat tersebut. Hanya saja yang merupakan prinsip dalam hal ini adalah proses adsorpsi yang merupakan dasar dari mekanisme pemisahannya. Gambaran mekanisme adsorpsi pada fasa terbalik adalah sebagai berikut:



Gambar 6.21. Mekanisme adsorpsi kolom fasa terbalik

Keterangan gambar:

1. Permukaan silika
2. Rantai C18
3. Molekul sampel

Ada pendapat lain yang mengatakan bahwa mekanisme pemisahan pada kolom fasa terbalik adalah partisi, Namun sebagian besar berpendapat bahwa proses pemisahan pada fasa kolom terbalik adalah adsorpsi.

Keuntungan kolom fasa terbalik:

- Senyawa polar polar akan lebih baik pemisahannya pada kolom fasa terbalik.
- Senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak terpisahkan pada fasa kolom normal akan dapat terpisahkan pada kolom fase terbalik
- Dengan kolom fase terbalik air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada pelarut pengembang campuran.

- **Oven Column**

Kolom HPLC diletakkan didalam oven untuk menjaga suhu kolom supaya stabil (tetap sesuai dengan program). Hal ini adalah sangat penting untuk memperoleh stabilitas dan keterandalan dalam analisis dengan metoda

HPLC. Oven Column yang banyak dipakai adalah dengan sirkulasi udara panas yang bertekanan. Oven column dapat memuat kolom HPLC sampai 4 kolom sekaligus dengan suhu kerja sampai 99 °C.

- **Oven Column**

Sistem elusi isokratik mempunyai kelemahan, yaitu:

- Pada awal elusi menghasilkan resolusi yang kurang baik
- Pada elusi yang lebih lanjut menghasilkan penambahan lebar puncak dengan penurunan tinggi puncak
- Membutuhkan waktu analisis yang lama.



Gambar 6.22. Kromatogram yang dihasilkan oleh sistem elusi isokratik

Penggunaan sistem elusi gradien memberikan beberapa kelebihan dibandingkan dengan sistem elusi isokratik, yaitu:

- Memungkinkan untuk menghasilkan kromatogram yang ideal
- Menghasilkan resolusi yang optimum antar puncak
- Menghasilkan lebar puncak yang seragam untuk semua puncak
- Membutuhkan waktu analisis yang lebih pendek.



Gambar 6.23. Kromatogram yang dihasilkan oleh sistem elusi gradien

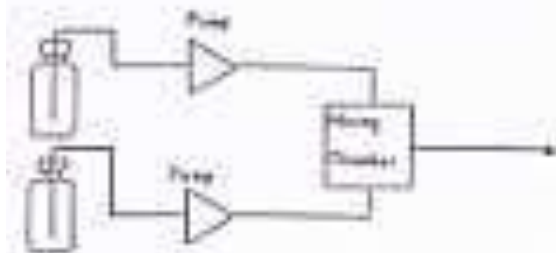
Ada dua macam sistem elusi gradien, yaitu:

1. Sistem elusi tekanan tinggi

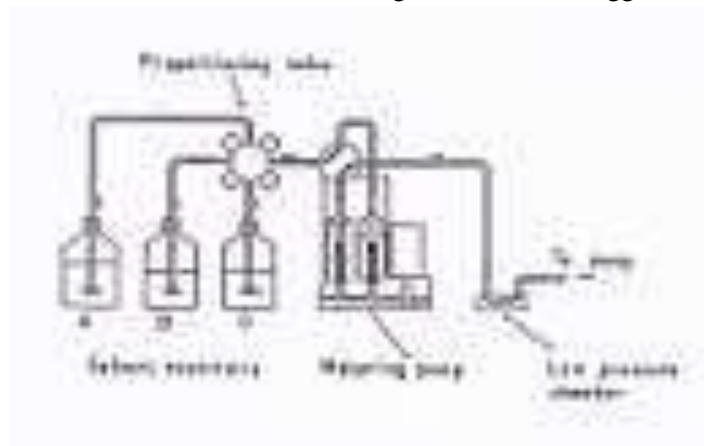
Dalam sistem ini pencampuran larutan pengembang dilakukan dengan memakai pompa-pompa bertekanan tinggi dari masing-masing botol, setelah itu langsung dielusikan ke dalam kolom.

2. Sistem elusi tekanan rendah

Dalam sistem ini pencampuran larutan pengembang dilakukan dengan memakai pompa-pompa bertekanan rendah dari masing-masing botol, kemudian setelah bercampur dielusikan dengan pompa bertekanan tinggi ke dalam kolom.



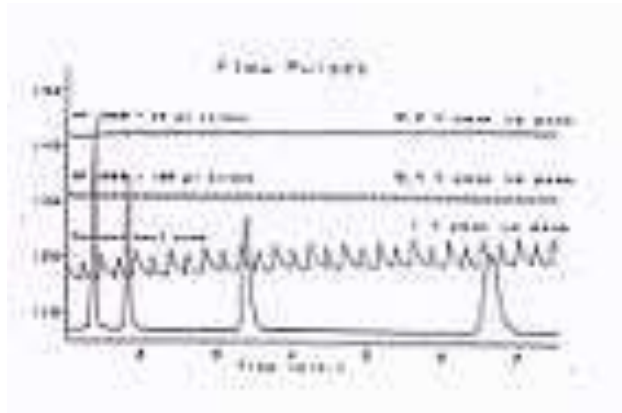
Gambar 6.24. Sistem elusi gradien tekanan tinggi



Gambar 6.25. Sistem elusi gradien tekanan rendah

Keuntungan pompa tekanan rendah dalam menuju kesalahan analisis metode HPLC adalah :

1. Terjadi penurunan volume pulsa, bukan menimbulkan penurunan frekuensi pulsa
2. Memberikan kecepatan alir fase mobil yang stabil
3. Menyebabkan sistem inlet aktif
4. Memberikan aliran gradien-geometrik yang terulangkan dan seketika.



Gambar 6.26. Pengaruh penurunan stroke volume



Gambar 6.27. Aliran gradien linier pompa tekanan rendah

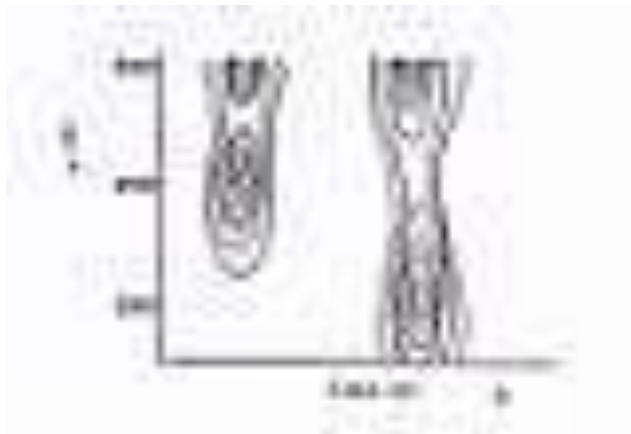
Penampilan kromatogram dua dan tiga dimensi

Penampilan kromatogram tiga dimensi hanya mungkin dilakukan oleh HPLC yang memakai detektor Photodiode array. Keuntungan

penampilan kromatogram tiga dimensi akan sangat membantu untuk menentukan kemurnian puncak kromatogram.



Gambar 6.28. Kromatogram tiga dimensi dari hasil pemisahan campuran Parasetamol, Profifenason dan Koffein



Gambar 6.29. Kromatogram tiga dimensi potongan melintang

6.4. PELAKSANAAN ANALISIS DENGAN HPLC

1. Pemilihan Pelarut Pengembang HPLC

Secara umum pelarut pengembang yang dipakai adalah metanol, acetonitril dan HTF (Tetrahidrofuran). Dalam memilih pelarut pengembang HPLC perlu diperhatikan : kekentalan (viskositas), daya mampat (kompresibilitas), indeks bias, UV *cut-of*, tekanan uap, titik bakar, nilai ambang batas, indeks kepolaran.

2. Pemilihan Kolom

Ada beberapa cara yang dapat digunakan yaitu :

- Dengan *trial and error* bila tersedia banyak pilihan.
- Menyamakan kolom yang digunakan untuk analit lain yang serupa.
- Mendapatkan informasi dari pustaka

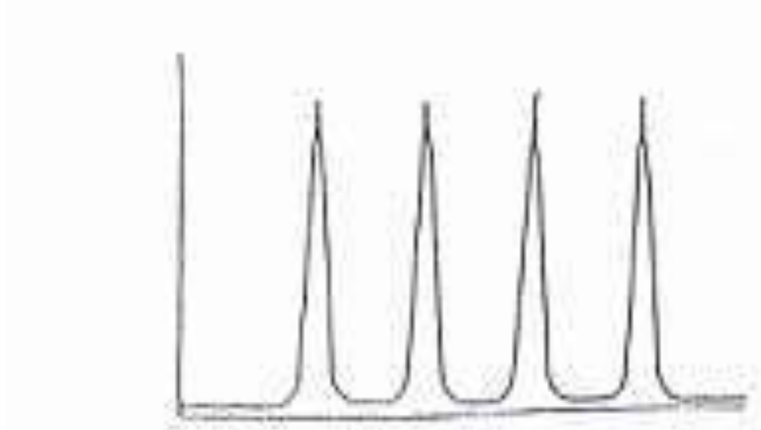
Selain itu diperlukan parameter kolom seperti : kecepatan, kapasitas, daya pisah, panjang kolom, tekanan kolom, parameter pendukung, struktur molekul analit, padatan pendukung dan lapisan film.

3. Penggunaan Kolom

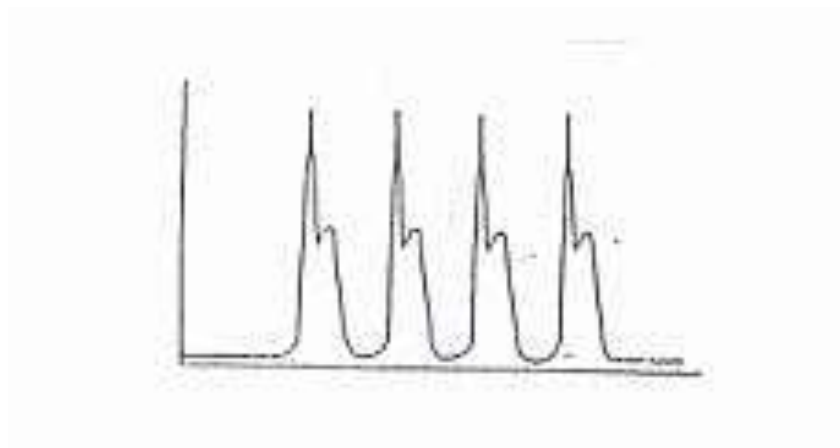
Sebelum digunakan sebaiknya kolom dialiri dengan pelarut pengembang yang kuat (metanol, eter, heksana), apabila sedang tidak digunakan kolom direndam dalam pelarut inert yang tidak mudah menguap (metanol, metanol-air, air suling).

4. Penyiapan Sampel

Sample diusahakan untuk dilarutkan dalam pelarut yang komposisinya sama dengan komposisi fase gerak yang dipakai.



Gambar 11.30. Kromatogram hasil pengukuran sample yang dilarutkan dalam komposisi yang sama antara pelarut dan fase gerak.



Gambar 6.31. Kromatogram hasil pengukuran sample yang dilarutkan dalam komposisi yang berbeda antara pelarut dan fase gerak.

6.5. METODA ANALISA HPLC

HPLC dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif terhadap sampel yang diamati.

1. Analisis Kualitatif

Mengacu pada :

- Waktu tambat puncak kromatogram analit yang dianalisis
- Pemurnian zat yang dianalisis dan melanjutkan dengan teknis yang lain
- Perbandingan dengan *library* yang ada perangkat lunak komputernya

Kendala yang dihadapi :

- Pemakaian waktu tambat
- Analisis kualitatif pasca kolom
- Analisis dengan detector Photodiode array
- Analisis dengan teknik terpadu.

2. Analisis Kuantitatif

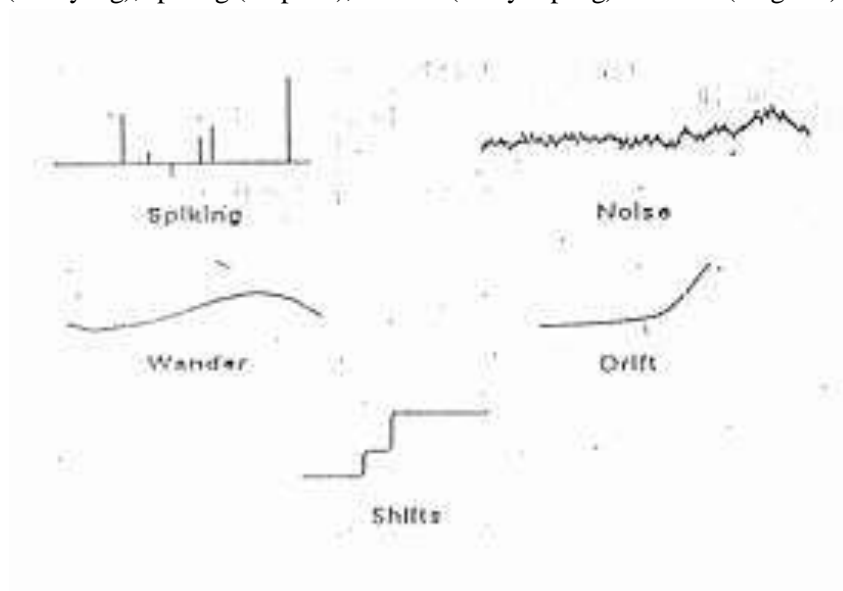
Dapat dilakukan secara sepihak, artinya tanpa mengacu pada zat standar acuan, atau dapat pula dilakukan perbandingan dengan zat standar acuan sebagai standar internal dan eksternal. Ada dua cara perhitungan

kuantitas analit : dengan mengukur tinggi puncak dan menentukan area puncak kromatogram.

Mengukur dengan tinggi puncak kromatogram dapat dilakukan lebih sederhana dan cepat akan tetapi puncak-puncak kromatogram yang besar banyak informasi kadar yang tidak terdeteksi. Untuk area puncak kromatogram ada empat cara yaitu : normalisasi area, normalisasi area : normalisasi area dengan faktor respons detektor, standarisasi dengan standar eksternal dan penambahan standar internal.

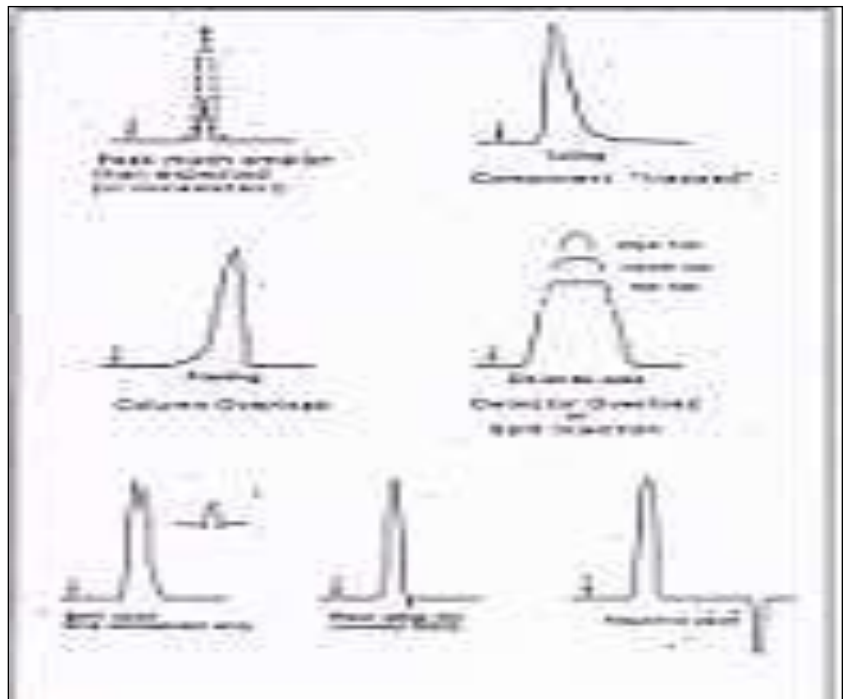
6.6. Gangguan Pada HPLC Dan Cara Penanganannya

Gangguan yang terjadi dibedakan menjadi dua yaitu : gangguan sistem garis dasar dan gangguan bentuk puncak. Gangguan sistem garis dasar (baseline) yang mungkin timbul antara lain : noise (derau), drift (melayang), spiking (berpaku), wander (menyimpang) dan shift (bergeser).

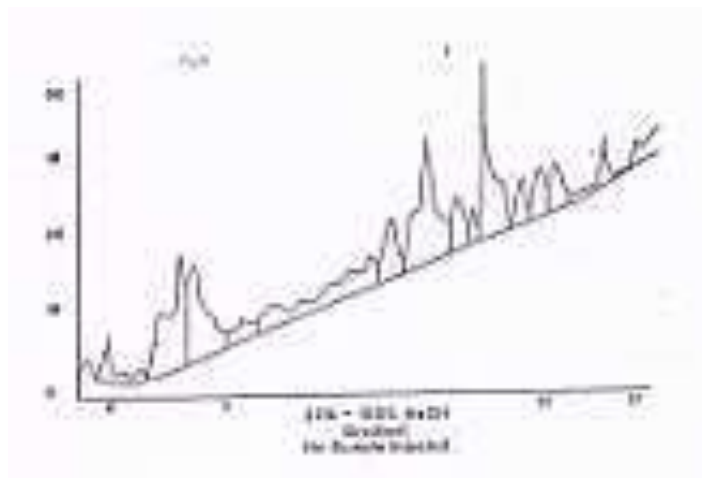


Gambar 6.32. Gangguan Sistem Garis Dasar

Sedangkan gangguan bentuk puncak (peak shape) yang mungkin timbul yaitu :Puncak lebih kecil dari yang diharapkan, Tailing (puncak), Fronting (puncak mengandung), Puncak berubah bentuk (cigar top, round top, flat top), Puncak membelah (split), Puncak negatif.



Gambar 6.33. Gangguan bentuk puncak



Gambar 6.34. Puncak-puncak hantu (ghost peaks)

6.7. CONTOH ANALISA

Menghitung kadar cafein dalam kratingdeng

$$\% \frac{b}{v} \text{ cafein dalam sampel} = \frac{\text{kons. sampel} \times \text{vol. total}}{\text{volume cuplikan}} \times 100\%$$

$$\text{kons. sampel} = \frac{\text{area sampel}}{\text{area standar}} \times \text{kons. standar}$$

- Area sampel dan area standar didapat dari hasil Running komputer, area cafein = 587,7 dan area kratingdeng = 639,6
- Membuat cafein standar : 100 ppm cafein dalam 10 ml aquabides, 100 ppm/10 ml = (100 mg/l)/10 ml = (100 mg/1000 ml)/10 ml = 1 mg, ditimbang 1 mg cafein standar dilarutkan dalam 100 ml aquabides, kons. cafein standar = 1 mg/100 ml = 10 mg/l = 10 ppm
- Sampel (kratingdeng) yang diambil 10 ml kemudian diencerkan dalam 100 ml aquabides, sehingga volume total = 100 ml

$$\begin{aligned} \text{kons. sampel} &= \frac{\text{area sampel}}{\text{area standar}} \times \text{kons. standar} \\ &= \frac{639,6 \text{ (mAs)}}{587,7 \text{ (mAs)}} \times 10 \text{ ppm} \\ &= 10,883 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\% \frac{b}{v} \text{ cafein dalam sampel} = \frac{\text{kons. sampel} \times \text{vol. total}}{\text{volume cuplikan}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \frac{b}{v} \text{ cafein dalam sampel} &= \frac{10,883 \frac{\text{mg}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}}{10 \text{ ml} \times 1000 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}} \times 100\% \\ &= \frac{1,0883 \text{ mg}}{10000 \mu\text{l}} \times 100\% \\ &= 1,0883\% \left(\frac{\text{mg}}{100 \mu\text{l}} \right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar cafein dalam kratingdeng} &= \frac{1,0883}{100} \left(\frac{\text{mg}}{0,0001 \text{ lt}} \right) \\ &= 108,83 \text{ ppm} \end{aligned}$$

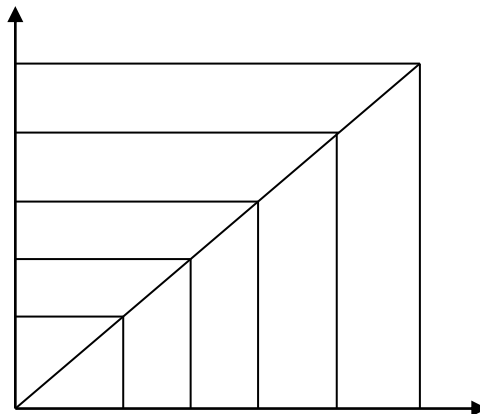
Atau dengan cara :

$$\begin{aligned}
 \% \frac{b}{v} \text{ cafein dalam sampel} &= \frac{10,883 \frac{\text{mg}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,0883 \text{ mg} \times \frac{\text{gr}}{1000 \text{ mg}}}{10 \text{ ml}} \times 100 \% \\
 &= \frac{1,0883 \text{ mg} \times \frac{\text{gr}}{1000 \text{ mg}} \times 10}{10 \text{ ml} \times 10} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,010883 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} \times 100 \% \\
 &= 1,0883 \% \left(\frac{\text{gr}}{100 \text{ ml}} \right)
 \end{aligned}$$

$$\text{Kadar cafein dalam kratingdeng} = \frac{1,0883}{100} \left(\frac{1000 \text{ mg}}{0,1 \text{ lt}} \right) = 108,83 \text{ ppm}$$

Jika dilakukan injeksi 5 sampel, jika tidak memenuhi kedekatan hasil (r) maka dilakukan injeksi ulang pada sampel daerah yang tidak memenuhi r. r maksimum = 0,999 atau r minimum = 0,8 menunjukkan kualitas kolom

Regresi linier standar



Gambar 6.35. Gambar kurva kalibrasi

Dari regresi linier standar diperoleh persamaan garis linear dan r , Area sampel dimasukkan dalam persamaan linear yang diperoleh dari regresi linier standar, sehingga diperoleh konsentrasi sampel.

$$\% \frac{b}{v} \text{ kafein dalam sampel} = \frac{\text{kons. sampel} \times \text{vol. total}}{\text{volume cuplikan}} \times 100\%$$

6.8. LATIHAN SOAL

Berilah tanda silang pada huruf B jika pernyataan di bawah ini Benar dan huruf S jika pernyataan Salah

- 1). B - S Perkembangan HPLC berawal dari proses pemisahan yang berazaskan absorpsi dari partisi ke arah yang lebih luas yaitu proses pemisahan yang berazaskan afinitas, filtrasi gel dan ion yang berpasangan, akan tetapi proses pemisahannya tetap dilaksanakan didalam kolom disertai pemakaian pelarut pengembang dengan tekanan tinggi.
- 2). B - S Ruang lingkup Penggunaan HPLC sering tumpang tindih dengan penggunaan Kromatografi Gas. Secara umum, biaya yang digunakan untuk keperluan HPLC lebih kecil dari pada kromatografi gas, sehingga seolah-olah kromatografi gas akan lebih banyak dari pada HPLC.
- 3). B - S Parameter-parameter yang dapat digunakan untuk mengetahui kualitas suatu kromatogram, yaitu : waktu tambat, faktor kapasitas, jarak setara plat teori, resolusi dan faktor simetri.
- 4). B - S JSPT adalah panjang kolom kromatografi (mm) yang diperlukan sampai terjadinya satu kali kesetimbangan distribusi dinamis molekul analit dalam fase gerak saja.
- 5). B - S Dalam sistem ini pencampuran larutan pengembang dilakukan dengan memakai pompa-pompa bertekanan rendah dari masing-masing botol, kemudian setelah bercampur dielusikan dengan pompa bertekanan tinggi ke dalam kolom.

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

- 6). B - S Oven Column yang banyak dipakai adalah dengan sirkulasi udara panas yang bertekanan, Oven column dapat memuat kolom HPLC sampai 4 kolom sekaligus dengan suhu kerja sampai 100 °C.
- 7). B - S Injeksi sampel untuk dianalisis dengan metoda HPLC merupakan tahap yang penting, karena meskipun kolom telah memadai, hasil kromatogram yang ditampilkan tidak akan memadai kalau injeksi sampel tidak dilakukan dengan tepat, keadaan ini akan menjadi suatu keharusan apabila yang dituju analisis kuantitatif dengan HPLC
- 8). B - S Untuk mendapatkan fasa yang non polar silika gel direaksikan dengan klorosilan Cl-Si(R)_n, fasa diam yang polar yang banyak dipakai adalah jenis C18, C8 dan C2.
- 9). B - S Pada umumnya efisiensi kolom HPLC meningkat dengan semakin kecilnya ukuran partikel yang ada didalam kolom, kolom fasa terbalik (RP) yang menggunakan silika mempunyai 50000 pelat/meter bila dikemas dengan menggunakan partikel yang berukuran 5 µm.
- 10). B - S Kesetimbangan analit didalam fasa gerak dan fasa diam merupakan suatu kesetimbangan yang dinamis, artinya fraksi waktu analit berada dalam fasa gerak setara terhadap fraksi jumlah analit yang berada di dalam fasa diam.

Lingkarilah a, b, c, d pada jawaban yang saudara anggap paling benar.

- 1). Kromatografi dengan kolom konvensional mempunyai fasa diam normal yang bersifat polar, misalnya silika gel. Sedangkan fasa geraknya bersifat non polar, sehingga analit yang akan dipisahkan adalah analit yang bersifat non polar: a. non polar, b. polar, c. bi-polar, d. mono-polar.
- 2). Untuk mendapatkan harga H_{min} dan μ_{opt} , maka ada beberapa hal yang perlu diperhatikan selama pelaksanaan HPLC, yaitu: a. Suhu kolom diatur supaya berubah, b. Efek difusi diusahakan sekecil mungkin, c. Laju aliran fasa diam harus konstan, d. faktor lain yang mengganggu keseimbangan desorpsi.

- 3). Injeksi sampel untuk dianalisis dengan metoda HPLC merupakan tahap yang penting, karena meskipun kolom telah memadai, hasil kromatogram yang ditampilkan tidak akan memadai kalau injeksi sampel tidak dilakukan dengan tepat, oleh sebab itu perlu diketahui berbagai sistem injektor HPLC yang umum dipakai, ada tiga macam sistem injektor pada HPLC yaitu: a. Injektor dengan memakai multi-fragma, injektor dengan pipa dosis, sistem injeksi otomatis, b. Injektor dengan memakai diafragma, injektor dengan pipa dosis, sistem injeksi non-otomatis, c. Injektor dengan memakai diafragma, injektor dengan pipa dosis, sistem injeksi otomatis d. Injektor dengan memakai diafragma, injektor dengan pipa dosis, sistem injeksi non-otomatis.
- 4). Keuntungan kolom fasa terbalik adalah: a. Dengan kolom fase terbalik acetonitril dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada pelarut pengembang campur; b. Senyawa non-polar akan lebih baik pemisahannya pada kolom fasa terbalik, c. Senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak terpisahkan pada fasa kolom tidak normal akan dapat terpisahkan pada kolom fase terbalik, d. Dengan kolom fase terbalik air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada pelarut pengembang campur.
- 5). Kalau analisa dengan HPLC dapat dilaksanakan dengan baik, maka dapat dikatakan derajatnya sama dengan GLC (Kromatografi Gas Cair) yang memakai kolom kapiler, HPLC memiliki beberapa keuntungan seperti: a. Dapat dilakukan pada suhu kamar, b. Bahan dan pelarut pengembang dapat digunakan berkali-kali, c. Detector HPLC tidak dapat divariasi dan sedikit jenisnya, d. Waktu analisis pada umumnya lama.

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

DAFTAR PUSTAKA

- Buckle, KA, (1985), "Ilmu Pangan", Universitas Indonesia, Jakarta.
- Biocher, J.C. dan Busta, F.F. 1983. Bacterial Spore Resistance to Acid. Food Technol. 37 (11) : 87 – 99.
- Brock, T.D. 1974. Biology of Microorganisme. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs. New Yersey.
- Carter, G.R. 1976. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Michigan State University Press., East Lansing.
- Cook, F.K. dan Pierson, M.D. 1983. Inhibition of Bacterial Spores by Antimicrobials. Food Technol. 37 (11) : 115 – 126.
- Cooney, C.L. 1981. Growth of Microorganisms. Dalam : Biotechnology, vo. 1, Microbial Fundamentals (Rehm, H.J. dan Reed, G., eds). Verlag Chemie, Weinheim.
- Doores, S. 1983. Bacterial Spore Resistance-species of Emerging Importance. Food Technol. 37 (11) : 127 – 134.
- Dwidjoseputro, D. 1984. Dasar-dasar Mkrobiologi. Penerbit Djambatan.
- Fardiaz, S. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. Diterbitkan Bekerja Sama dengan PAU Pangan dan Gizi IPB. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama , Jakarta. 1992.
- Fardiaz,S. 1987. Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan. Lembaga sumber Daya Informasi.
- Fengel D., Wegener, G. (1985), " KAYU (Kimia Ultrastruktur Reaksi-Reaksi)", UGM Press Yogyakarta.
- Fessenden, R and Fesenden J., 1990, "Organic Chemistry", thirth edition, edisi terjemahan Indonesia oleh Hadiyana., 1994, "Kimia Organik", jilid I ed 3., pp.310-323,Erlangga, Jakarta.

- Fiesser dan Fisser, (1963), "Pengantar Kimia Organik", Dhiwantara, Bandung.
- Foegeding, P.M. 1983. Bacterial Spore Resistance to Chlorine Compound. Food Technol. 37 (11) : 100 – 104.
- Frazier, W.C. and Westhoff, 1981. Food Microbiology. 3th Ed. Tata Mc Graw-Hill Publishing Company Ltd. New Delhi.
- Gombas, D.E. 1983. Bacterial Spore Resistance to Heat. Food Technol. 37 (11) : 105 – 110.
- Jay, J.M. 1986. Modern Food Microbiology. 3th Ed. Van Nostrand Reinhold Company. New York.
- Judoamidjojo, Mulyono, (1992), "Teknologi Fermentasi", Rajawali Press Jakarta
- Ilroy R. J., (1990), "Pengantar Budidaya Padang Rumput Tropika". Kirk Othmer, "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 8, John Wiley and Sons. Inc.
- Muhammad Mulja, dan Kosasih Setia darma, Raslin Rasyid, "Analisis Perbandingan Testosteron dan Estradiol dengan metoda Densitometri di dalam plasma dan urine, Disertasi, ITB, 1990.
- Mulja, M. dan Suharman, 1995, "Analisis Instrumental", ed.1, Airlangga University Press, Surabaya.
- Operator's Manual Ver 3.74, BUCK SCIENTIFIC 210VGP Atomic Absorption Spectrophotometer.
- Yuwono M., Validierte Fluoridbestimmung in verschiedenen Matrices mittels Ionensensitiver Elektroden (ISE) und Gas Chromatographie (GC), Dissertation Wurzburg Germany, 1998.
- Moat, A.G. 1979. Microbial Physiology. John Wiley and Sons, New York.
- Pelczar, M.J.Reid, R.D. dan E.C.S. Chan 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi (Terjemahan) Universitas Indonesia (UI) Press. Jakarta.

- Peppler, H.J. 1977. Yeast Properties Adversely Affecting Food Fermentation. Food Techol. 31 (2) : 62 – 65.
- Phaff, H.J., M.W. Miller dan E.M. Mark, 1968. The Life of Yeast. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts.
- Ray, B. 1996. Fundamental Food Microbiology, CRC Press Boca Raton.
- Ristanto, 1989. Kursus Singkat Fisiologi Bakteri. Petunjuk Praktikum. PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Sardjoko, (1991), “Bioteknologi”, Gramedia, Jakarta.
- Soebijanto T., (1986), “HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya”, Gramedia Jakarta.
- Sari N. K., Kuswandi, Nonot S., Renanto Handogo, (2006), “Komparasi Peta Kurva Residu Sistem Turner ABE Dengan Metanol-Etanol-1-Propanol”, Jurnal REAKTOR, Jurusan Teknik Kimia UNDIP Semarang, Vol. 13, No. 2.
- Sari N. K., Kuswandi, Nonot S., Renanto Handogo, (2007), “Pemisahan Sistem Biner Etanol-Air Dan Sistem Turner ABE Dengan Distilasi Batch Sederhana”, Jurnal INDUSTRI Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi, Fakultas Teknik Industri ITS Surabaya Vol. 6, No.5.
- Sari N. K., ”Kajian Produksi Bioethanol Dari Rumput Gajah secara Proses batch”, Hibah Bersaing DIKTI 2009.
- Sari N. K., ”Kajian Produksi Bioethanol Dari Rumput Gajah secara Proses Semi Kontinyu”, Hibah Bersaing DIKTI 2010.
- Sari Ni Ketut, “Bioethanol Production from Liquid Waste of Rice Flour with Batch Process”, MATEC Web of Conferences 58, 01003, 2016
- Sari Ni Ketut, “Numerical of Bioethanol Production from Liquid Waste of Rice Flour by Distillation Process”, MATEC Web of Conferences 58, 01014, 2016

<http://209.85.175.104/search?q=cache:RlQSmXmLfvQJ:manglayang.blogspot.com/2005/12/31/hijauan-pakan-ternak-rumput-gajah-pennisetumpurpleum/+kandungan+rumput+gajah&hl=id&ct=clnk&cd=2&gl=id>

Stevenson, K.E. dan B.D. Shafer 1983. Bacterial Resistance to Hydrogen Peroxide. Food Techol. 37 (11) : 111 – 114.

Kuswanto, K.R. dan S. Sudarmadji 1989. Mikrobiologi Pangan. PAU Pangan dan Gizi. Uni versitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Wibowo, D. dan Ristanto 1988. Petunjuk Khusus Deteksi Mikrobia Pangan. PAU Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Agus k., Budiyanto, 2002, “Mikrobiologi Dasar”, pp. 71–75, Universitas Muhammadiyah Malang.

Alok Kumar Dubey, P.K. Gupta, Neelam Garg, Sanjay Naithani, (2012), “ Bioethanol Production from Waste Paper Acid Pretreated Hydrolyzate with Xylose Fermenting Pichia Stipitis,” Carbohydrate Polymers, 88, 825-829.

Bahri, Syamsul D., 1987, “Laporan Penelitian Pembuatan Alkohol dari Nira Aren dan Lontara”, pp. 11–13, Departemen Perindustrian Balai Penelitian Kimia, Ujung Pandang.

Balat, M., H. Balat and O. Cahide, (2008), “Progress in Bioethanol Processing,” Prog. Energy. Combust. Sci., 34, 551-73.

Demirbas, A., (2011), “Competitive Liquid Biofuels from Biomass,” Appl. Energy, 88, 17-28.

Groggins, P H., 1958, “Unit Processes in Organic Synthesis”, 5th ed., Mc. Graw Hill Kogakasha, Tokyo.

Gumbira Sa'id, E., 1987, “Bioindustri, Penerapan Teknologi Fermentasi”, pp. 264-273, PT. Melton Putra, Jakarta.

Henley dan Seader, 1998, ”Separation Process”, Publishing Comp. Inc. 1998, New York.

- Kartika, B., 1992, "Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian", pp. 209–218, Pusat Antar Universitas, UGM., Yogyakarta.
- Rahman, Faizul, dkk., 2012, "Pabrik Bioetanol Dari Sekam Padi Dengan Metode Pretreatment Dilute Acid Menggunakan Proses SFF (Simultaneous Saccharification And Fermentation)".
- Kuhad, R. C., R. Gupta, Y. P. Khasa and A. Singh, (2010), "Bioethanol Production from Lantana Camara (Red Sage): Pretreatment, Saccharification and Fermentation," *Biores.Tech.*, 101, 8348-8354.
- Kumar, A., L.K. Singh and S. Ghose, (2009), "Bioconversion of Lignocellulosic Fraction of Water-Hyacinth (*Eichhornia Crassipes*) Hemicellulose Acid Hydrolysate to Ethanol by *Pichia Stipitis*," *Biores.Tech.*, 100, 3293-3297.
- Limayem, A. And S. C. Riche, (2012), "Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production: Current Perspectives, Potential Issues and Future Prospects," *Prog. Energ. Combust. Sci.*, 38, 449-67.
- Nibedita Sarkar, Sumanta K. G., Satarupa Bannerjee, Kaustav Aikat, (2012), "Bioethanol Production from Agricultural Wastes: An Overview," *Renewable Energy*, 37, 19-27.
- Sari N. K., Kuswandi, Nonot S., Renanto Handogo, 2006, "Komparasi Peta Kurva Residu Sistem Turner ABE Dengan Metanol-Etanol-1-Propanol", *Jurnal REAKTOR*, Jurusan Teknik Kimia UNDIP Semarang, Vol. 10, No. 2.
- Sari N. K., Kuswandi, Nonot S., Renanto Handogo, 2006, "Pemisahan Sistem Biner Etanol-Air Dan Sistem Turner ABE Dengan Distilasi Batch Sederhana", *Jurnal INDUSTRI Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi*, Fakultas Teknik Industri ITS Surabaya Vol. 6, No.2.
- Sari N. K., 2009, "Produksi Bioethanol Dari Rumput Gajah Secara Kimia", *Jurnal Teknik Kimia*, UPN "Veteran" Jatim, Vol. 4, No.1.

Teori Dan Aplikasi Pembuatan...

- Sari N. K., C. Pujiastuti, 2012, "Study of Bioethanol Production from Liquid Waste of Bogasari Factory In Mini Plant Scale", Proc. RSCE 2012 ITS Surabaya Bali Indonesia, ISBN.978-602-9494-30-3, pp.A.31.1-31.6.
- Sari N. K., C. Pujiastuti, I Nyoman Abdi, 2013, "Bioethanol Production Comparison of Elephant Grass and Liquid Waste Plant Wheat Boga Sari",Internasional Seminar on Chemical Engineering Bio Energy, Chemicals and Materials (BioEnChe2013), ITB Bandung, Indonesia.
- Sari N. K., C. Pujiastuti, I Nyoman Abdi, 2013, " Simulation of Batch Distillation Binary System Based Object-Oriented Programming, 20th Regional Symposium on Chemical Engineering (RSCE 2013), Philipina.
- Saravana Kannan Thangavelu, Abu Saleh Ahmed, Farid Nasir Ani, (2014), "Bioethanol Production from Sago Pith Waste Using Microwave Hydrothermal Hydrolysis Accelerated by Carbon Dioxide," Applied Energy, 128, 277-283.
- Teymouri, F., L. Laureano-Peres, H. Alizadeh and B. E. Dale, (2005), "Optimization of the Ammonia Fiber Explosion (AFEX) Treatment Parameters for Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover," Biores. Tech., 96, 2014-2018.